



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA**

**JOANNA FERREIRA GODINHO**

**HIDROGÉIS DE CELULOSE BACTERIANA INCORPORADOS  
COM FRAÇÕES DE *Aloe vera***

Florianópolis  
2014



**Joanna Ferreira Godinho**

**HIDROGÉIS DE CELULOSE BACTERIANA INCORPORADOS  
COM FRAÇÕES DE *Aloe vera***

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

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Daliana Müller

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Fernanda Vieira Berti

Florianópolis  
2014

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

Ferreira Godinho, Joanna  
HIDROGÉIS DE CELULOSE BACTERIANA INCORPORADOS COM FRAÇÕES  
DE Aloe vera / Joanna Ferreira Godinho ; orientador,  
Luismar Marques Porto ; coorientadora, Fernanda Vieira  
Berti e Daliana Müller. - Florianópolis, SC, 2014.  
116 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Engenharia de tecidos. 3.  
Celulose bacteriana. 4. Aloe vera. 5. L929. I. Marques  
Porto, Luismar. II. Daliana Müller, Fernanda Vieira Berti  
e. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa  
de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

**HIDROGÉIS DE CELULOSE BACTERIANA INCORPORADOS  
COM FRAÇÕES DE *Aloe vera*.**

Por

Joanna Ferreira Godinho

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

---

Prof. Dr. Luismar Marques Porto  
**orientador**

---

Dr.<sup>a</sup> Daliana Müller  
**co-orientadora**

---

Dr.<sup>a</sup> Fernanda Vieira Berti  
**co-orientadora**

---

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado  
**coordenador**

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Derce de Oliveira Souza Recouvreux

---

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Melissa Camassola

**Florianópolis, 18 de março de 2014.**



Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz e Juliana, ao meu companheiro Felipe, aos meus tios, Jurema e Ionir, e aos meus primos, Eduardo e Leonardo pelo imenso carinho, amor, apoio, dedicação e paciência de todos.





## AGRADECIMENTOS

A finalização dessa dissertação marca uma etapa importante da minha vida e não seria possível sem a oportunidade, os ensinamentos, o apoio, carinho, amizade e dedicação de cada pessoa que esteve presente durante toda esta jornada.

Agradeço aos meus pais, Luiz Henrique e Juliana, pelo imenso apoio, amor, carinho e compreensão nas dificuldades e tomadas de decisão dessa jornada. A minha tia Jurema e tio Ionir, pelas diversas discussões a cerca de demasiados temas, que me engrandeceram e me ajudaram a firmar o caminho pelo conhecer mais. Aos meus primos Eduardo e Leonardo pelos vários momentos de descontração e pela imensa amizade e consideração que temos uns pelos outros.

Ao meu companheiro, Felipe, que incondicionalmente me deu apoio, amor, carinho, cumplicidade e parceria em todos os momentos.

Aos Professores Dr. Luismar Marques Porto e Dr. Carlos Renato Rambo pela oportunidade, orientações, apoio, pela motivação, ensinamentos e amizade.

Às minhas co-orientadoras Dr<sup>a</sup>. Fernanda Vieira Berti e Dr<sup>a</sup>. Daliana Muller pelo imenso carinho, amizade, incentivo, apoio, contribuições, confiança e pelos momentos de descontração.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Cíntia Soares pela sua amizade, ensinamentos, orientações, sua cumplicidade e pelas suas aulas, que me motivaram a querer mais.

À Dr<sup>a</sup>. Renata A. N. Pértile pela amizade, carinho e pelas contribuições em todos os momentos.

Aos amigos que durante toda essa jornada estiveram presentes Julia de V. Castro, Camila Paes, Karina Cesca, Edroaldo L. da Rocha, Charles Kondageski, João Lopes, Guilherme Colla, Ericka Cirigo, Drielle Souza, Lya Piaia, Samara S. de Souza, Isla F. Pereira, Alencar Cabral, Jéssica B. Cruz, João C. S. Lobe, Beatriz da R. Espíndola, Camila Schroeder, Fernanda P. Rotunno, Tuane C. Antonio, Isadora Rufino, José O. S. Fernandes, Lígia Assunção, Vinicius Jacques pelos maravilhosos momentos de descontração, companheirismo, amizade e apoio de vocês.

Aos amigos que estão longe Maxi Caciccedo, Virginia Scotta Taisa R. S. da Silva, Danilo H. da Silva, Tatiane Amadio, Eliane M. Dutra, Marta V. Vinha e Shana G. Boff pela nossa amizade, carinho e cumplicidade, que mesmo com a distância, continua forte.

Aos amigos que sempre estiveram comigo Gabriela S. Ferreira, Mariana S. da Rosa, Murilo B. Rossinholi, Bruna Turczyn, Gustavo

Hassemer, Leonardo Filomeno, Diego Nakayama, Pablo G. Farias, Rafael C. B. de Castro, Rafael Polezzi, Marina Martins, Rafael B. Uriarte, Augusto Westphal, Julio Tomaschitz, William Bach por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos, pela nossa valiosa amizade que se estende há décadas, pelo imenso apoio, carinho e cumplicidade.

À Deise R. Consoni e Eliana de M. Oliveira, do LCME, pelas análises de MEV, contribuições e momentos de descontração.

Ao CNPq, CAPES e FINEP pelo apoio financeiro.

“... É chato chegar  
A um objetivo num instante  
Eu quero viver  
Essa metamorfose ambulante  
Do que ter aquela velha opinião  
Formada sobre tudo...”  
(Raul Seixas)



## RESUMO

A *Aloe vera*, popularmente denominada babosa no Brasil, é uma planta originária da África, utilizada por culturas antigas do Mediterrâneo e do Egito devido às suas propriedades terapêuticas e medicinais. O extrato do parênquima de reserva desta planta, denominado gel de *A. vera*, apresenta ampla gama de compostos que possuem atividades farmacológicas de interesse medicinal. A incorporação de porções de *A. vera* no desenvolvimento de novos materiais, como a celulose bacteriana (CB), promove alterações morfológicas, mecânicas e químicas de grande interesse para engenharia tecidual e na produção de novas classes de dispositivos biomédicos. Na produção dos hidrogéis celulose bacteriana e *A. vera*, o meio de cultura da bactéria *Gluconacetobacter hansenii* foi formulado com três porções de *A. vera*, variando as concentrações de 20%, 40%, 60%, 80% a 100% (v/v). Apenas as formulações de 20%, 40% e 60% (v/v), das três porções, produziram com sucesso materiais com características distintas e singulares de microestrutura, caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV); de propriedades mecânicas, químicas, avaliadas qualitativamente por espectroscopia de infravermelho por refletância total atenuada (FTIR-ATR); e também foram caracterizadas quanto à capacidade de absorção de água e cristalinidade. Além disso, células de fibroblastos da linhagem L929, foram semeadas sobre os materiais para avaliação da citotoxicidade, adesão e morfologia celular em função do tempo. Os fibroblastos permaneceram viáveis em até 48 horas de cultura em todos os hidrogéis desenvolvidos e apresentaram morfologia alongada e melhor aderência nas membranas formuladas com 60% das três porções. Os materiais formulados com 60% de *A. vera* na celulose bacteriana se mostraram plataformas promissoras para o desenvolvimento de dispositivos para regeneração de pele.

**Palavras-chave:** Engenharia de tecidos, celulose bacteriana, *Aloe vera*, L929, biomateriais.



## ABSTRACT

*Aloe vera*, usually known in Brazil as “babosa”, originary plant from Africa, was used by ancient cultures of the Mediterranean and Egypt due to therapeutic and medicinal properties. The parenchyma reserve extract of this plant, called *A. vera* gel, presents a wide range of compounds which has pharmacological activities of medicinal interests. The incorporation of *A. vera* portions in development of new materials, such as bacterial cellulose (BC), promotes morphological, chemical and mechanical changes of great interests for tissue engineering and production of new classes of biomedical devices. In the production of bacteria cellulose and *A. vera* hydrogels, the culture medium of the bacteria *Gluconacetobacter hansenii* was formulated with three portions *A. vera*, ranging the concentrations from 20%, 40 %, 60 %, 80% to 100% (v/v). Only formulations of 20 % , 40 % and 60 % (v/v), for three portions, produced successfully materials with distinct and unique characteristics of microstructure; characterized by scanning electron microscopy (SEM); mechanical and chemical properties; evaluated qualitatively by infrared spectroscopy by attenuated total reflectance (FTIR-ATR), and were also characterized by their ability to absorb water and crystallinity. Moreover, fibroblast cells of the L929 strain were seeded on the material to evaluate cytotoxicity, cell adhesion and morphology as a function of time. Fibroblasts remained viable for up to 48 hours of culture, in all developed hydrogels, and showed elongated morphology and better adhesion on the membranes formulated with 60 % of the three portions. The materials formulated with 60% of *A. vera* into bacterial cellulose proved are promising *scaffold* for the development of new devices for skin regeneration.

**Keywords:** Tissue engineering, bacterial cellulose, *Aloe vera*, L929, biomaterials.





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Dois materiais suculentos que constituem a folha da <i>Aloe barbadensis</i> Miller: gel e látex.....	36
Figura 2 – Conceito de Engenharia de Tecidos .....	39
Figura 3 – Estrutura física da pele.....	41
Figura 4 – Representação da estrutura química da celulose e as ligações de hidrogênio inter e intramoleculares.....	43
Figura 5 – Versatilidade das aplicações biomédicas de materiais a base de celulose bacteriana.....	44
Figura 6 – Plantação de <i>Aloe barbadensis</i> Miller nas instalações da empresa Naturama - Indústria e Comércio de Produtos Agropecuários Ltda, em Paulo Lopes, Santa Catarina. ....	53
Figura 7 – Fluxograma do processo de separação das frações T, G e F.54	
Figura 8 – Espectros de FTIR-ATR das frações de <i>Aloe vera</i> T, G e F.58	
Figura 9 – Microestrutura das porções autoclavadas G, F e T. ....	60
Figura 10 – Semelhança dos hidrogéis de celulose bacteriana e CB-Aloe: a) CB, b) CB-20F, c) CB-20G, d) CB-20T, e) CB-40F, f) CB-40G, g) CB-40T, h) CB-60F, i) CB-60G e j) CB-60T.....	73
Figura 11 – Micrografias dos hidrogéis liofilizados de CB (a–c), CB-20F (d–f), CB-40F (g–i) e CB-60F (j–m) evidenciando: faces superior, inferior e fratura.....	75
Figura 12 – Micrografias dos hidrogéis liofilizados de CB-20G (a–c), CB-40G (d–f) e CB-60G (g–i) evidenciando: fratura, face inferior e face superior. ....	76
Figura 13 – Micrografias dos hidrogéis liofilizados de CB-20T (a–c), CB-40T (d–f) e CB-60T (g–i) evidenciando: fratura, face inferior e face superior. ....	77
Figura 14 – Detalhes da microestrutura interna da membrana CB-40T: Conexão das lamelas por microfibrilas (1-b), lamelas na parte superior da membrana (2-c) e a superfície superior de uma lamela na região inferior (3-d).....	78
Figura 15 - Detalhes da microestrutura interna da membrana CB-60T: Poro na região inferior (1-b), poros e lamelas superiores (2-c) e poros internos (3-d).....	78
Figura 16 – Ilustração da formação da fibra de celulose em meio manitol e a desorganização da formação das fibras em meio suplementado com polissacarídeos. ....	80
Figura 17 – Massa percentual dos hidrogéis de CB, CB-T, CB-G e CB-F nas suas diferentes composições após serem liofilizadas (a) e a capacidade de absorção de água dos hidrogéis de CB. Os dados das	

massas foram normalizados com a massa da membrana CB e representados com a média $\pm$ EPM.....	81
Figura 18 – Espectros de FTIR-ATR das membranas formuladas com as distintas frações de <i>A. vera</i> CB-F (a), CB-G (b) e CB-T (c), da CB pura (a -c) e das frações isoladas (T, G e F) (d).....	83
Figura 19 – Destaque das principais bandas das membranas formuladas com as frações de <i>A. vera</i> , da CB (a–c) e de F, G e T (d). .....	84
Figura 20 – Curva de tensão $\times$ deformação dos hidrogéis de celulose bacteriana e CB-F (a), CB-G (b) e CB-T (c). Dados representativos de uma repetição desta análise.....	86
Figura 21 – Difractogramas de raios X das membranas de CB, CB-60F, CB-60G, CB-60T. ....	88
Figura 22 – Viabilidade celular dos fibroblastos cultivados na superfície lisa dos hidrogéis de CB e CB-F.....	89
Figura 23 – Viabilidade celular dos fibroblastos cultivados na superfície lisa dos hidrogéis de CB e CB-G. ....	89
Figura 24 – Viabilidade celular dos fibroblastos cultivados na superfície lisa dos hidrogéis de CB e CB-T.....	90
Figura 25 – Adesão dos fibroblastos L929 cultivados sobre os hidrogéis de CB (a–b) e CB-F (c–h) em diferentes formulações após 24 e 48 horas de cultura <i>in vitro</i> . ....	91
Figura 26 – Adesão dos fibroblastos L929 cultivados sobre os hidrogéis de CB-G em diferentes formulações (a–f) após 24 e 48 horas de cultura <i>in vitro</i> . ....	92
Figura 27 – Adesão dos fibroblastos L929 cultivados sobre os hidrogéis de CB-T em diferentes formulações (a–f) após 24 e 48 horas de cultura <i>in vitro</i> . ....	93
Figura 28 – Células de fibroblasto L929 cultivadas sobre os hidrogéis CB, CB-60T, CB-60F e CB-60G após 48 horas de cultura. Núcleo corado com DAPI (azul) e citoesqueleto com faloidina (vermelho). ....	96
Figura 29 – Células de fibroblastos L929 que permanecem metabolicamente viáveis (coradas em verde) após 24 e 48 horas de cultivo sobre os hidrogéis CB (a), CB-60F (b), CB-60G (c) e CB-60T (e).....	97

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Correlação entre alguns dos componentes e as propriedades farmacológicas do gel de <i>A. vera</i> .....	37
Quadro 2 – Formulações dos hidrogéis de celulose bacteriana (% v/v).	68



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de rendimento em massa seca das frações T, G e F. Dados representados com a média $\pm$ EPM. ....	56
Tabela 2 – Atribuições das bandas dos espectros de FTIR-ATR das frações T, G e F. ....	59
Tabela 3 – Variação do diâmetro das fibras conforme a formulação do hidrogel. Diâmetro representado com a média $\pm$ EPM. ....	79
Tabela 4 – Propriedades mecânicas dos hidrogéis de CB. Dados representados com a média $\pm$ EPM. ....	87



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**A. vera:** *Aloe vera*

**ATR:** Refletância total atenuada

**CB:** celulose bacteriana

**CB-Aloe:** plataformas compósitas de celulose bacteriana e *Aloe vera*

**EPM:** erro padrão da média

**ET:** engenharia de tecidos

**F:** fração polissacarídica insolúvel em etanol

**FTIR:** Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

**G:** fração de gel de *A. vera* homogeneizada e centrifugada

**G<sub>L</sub>:** fração de gel de *A. vera* homogeneizada, centrifugada e liofilizada

**InteLab:** Laboratório de Tecnologias Integradas

**LaMatE:** Laboratório de Materiais Elétricos

**MCM:** meio de cultura à base de manitol

**MEV:** Microscopia eletrônica de varredura

**MTS:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio

**PBS:** solução fosfato salina

**SEI:** solução estoque de inóculo 10%

**T:** fração de gel de *A. vera* homogeneizada contendo fibras





## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 .....	27
1 Introdução, motivação, justificativa e objetivos .....	29
1.1 Introdução, motivação e justificativa .....	29
1.2 Objetivos.....	31
1.2.1 Objetivo Geral .....	31
1.2.2 Objetivos Específicos .....	31
CAPÍTULO 2 .....	33
2 Fundamentação teórica.....	35
2.1 <i>Aloe vera</i> .....	35
2.2 Engenharia tecidual da pele.....	38
2.3 Celulose bacteriana.....	41
2.4 Modificações e aplicações da celulose bacteriana .....	44
CAPÍTULO 3 .....	49
3 Extração de diferentes frações de polissacarídeos de <i>Aloe vera</i> .....	51
3.1 Introdução.....	51
3.2 Materiais e métodos.....	53
3.2.1 Aquisição da matéria prima vegetal.....	53
3.2.2 Obtenção da fração polissacarídica insolúvel em etanol (F), do gel de <i>A. vera</i> homogeneizado e centrifugado (G) e do gel de <i>A. vera</i> homogeneizado contendo fibras (T).....	53
3.2.3 Caracterização das frações extraídas de <i>Aloe vera</i> .....	55
3.2.3.1 Rendimento da fração polissacarídica insolúvel em etanol (fração F), do gel de <i>A. vera</i> homogeneizado e centrifugado (fração G) e do gel de <i>A. vera</i> homogeneizado contendo fibras (fração T).....	55
3.2.3.2 Espectroscopia de infravermelho por refletância total atenuada (FTIR-ATR) .....	55
3.2.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	56
3.3 Resultados e discussão .....	56
3.4 Conclusões parciais .....	61
CAPÍTULO 4 .....	63
4 Hidrogéis de celulose bacteriana incorporados com porções de <i>A. vera</i> .....	65
4.1 Introdução.....	65
4.2 Materiais e métodos.....	67
4.2.1 Produção dos hidrogéis de CB com <i>A. vera</i> .....	67
4.2.1.1 Preparação do meio de cultura .....	67
4.2.1.2 Produção dos hidrogéis incorporados com frações de <i>A. vera</i> ..	67
4.2.1.3 Purificação dos hidrogéis produzidos .....	68

4.2.2 Caracterização dos hidrogéis de CB .....	68
4.2.2.1 Capacidade de absorção de água.....	68
4.2.2.2 Espectroscopia de infravermelho por refletância total atenuada (FTIR-ATR) .....	69
4.2.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	69
4.2.2.4 Propriedades mecânicas dos hidrogéis de celulose bacteriana..	70
4.2.2.5 Difração de raios X .....	70
4.2.3 Ensaio <i>in vitro</i> .....	70
4.2.3.1 Preparo dos hidrogéis para cultura de células.....	70
4.2.3.2 Semeadura das células .....	71
4.2.3.3 Avaliação da adesão, citotoxicidade e morfologia celular .....	71
4.2.4 Análise estatística.....	72
4.3 Resultados e discussão .....	72
4.3.1 Produção e caracterização dos hidrogéis de celulose bacteriana..	72
4.3.1.1 Morfologia e microestrutura .....	73
4.3.1.2 Diâmetro de fibras.....	79
4.3.1.3 Variação da massa e capacidade de absorção de água .....	80
4.3.1.4 Propriedades mecânicas .....	85
4.3.1.5 Cristalinidade .....	87
4.3.2 Avaliação da citotoxicidade, morfologia, viabilidade e adesão celular .....	88
4.3.2.1 Citotoxicidade e viabilidade celular.....	88
4.4 Conclusões parciais .....	98
CAPÍTULO 5 .....	99
5. Conclusões e sugestões futuras .....	101
5.1 Conclusões .....	101
5.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

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



# 1 INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

## 1.1 INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA

Na década de 2001 a 2011, a expectativa de vida da população mundial aumentou de 68 para 70 anos. Em alguns países esse aumento foi superior a média mundial como na França, que subiu de 79 para 82, nos Estados Unidos, de 77 para 79 anos, e no Brasil, de 71 para 74 anos. Como reflexo do aumento da expectativa de vida da populacional, os gastos com saúde também cresceram. No mesmo período, os gastos com saúde na França foram elevados de 11% para 11,6% do PIB, nos Estados Unidos, de 15,8 para 17,9%, e no Brasil de 7,1% para 8,9% do PIB. No intuito de reduzir os custos com saúde, as políticas de incentivo público estão focando no desenvolvimento de novos dispositivos e tecnologias que possam melhorar a qualidade de vida populacional. No último ano, o Ministério da Saúde e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) fomentaram R\$ 28 milhões em pesquisas políticas, estratégicas, educacionais, clínicas, estudos sobre doenças e o desenvolvimento de novas terapias e tecnologias aplicadas à saúde.

A reconstrução, reparação e manutenção de tecidos e órgãos, que por razões de doenças ou traumas tenham perdido parte de suas funções, é uma abordagem emergente e multidisciplinar que envolve conhecimentos das ciências da vida e de engenharia na compreensão da relação entre estrutura e função tecidual para o desenvolvimento de substitutos biológicos capazes de regenerar e/ou melhorar a função tecidual (PALSSON; BHATIA, 2004). Assim é definida a Engenharia de Tecidos (ET) que, na busca por substitutos biológicos adequados, expandiu o desenvolvimento de materiais com características essenciais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, porosidade suficiente para permitir trocas gasosas, fluxo de nutrientes e a permeação das células, propriedades mecânicas adequadas para sustentar a formação de novos tecidos, estrutura apropriada para induzir a adesão celular, a produção da matriz extracelular e o transporte de biomoléculas (TABATA, 2009; YANG *et al.*, 2001). Esses materiais podem ser de natureza sintética ou natural e de origem metálica, cerâmica, polimérica ou ainda um compósito deles, para buscar melhores propriedades para a aplicabilidade alvo (ALVAREZ; NAKAJIMA, 2009; JITHENDRA *et al.*, 2013; SASKA *et al.*, 2011).

Os biomateriais poliméricos têm uma ampla gama de aplicações na ET (SEAL; OTERO PANITCH, 2001). Os critérios de seleção de um biomaterial para esta aplicação envolvem a escolha de características estruturais, químicas, hidrofílicas/hidrofóbicas, absorção de água, massa molecular, degradabilidade e biocompatibilidade (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011).

Em especial, os polissacarídeos têm despertado grande interesse devido ao desenvolvimento de novas técnicas de síntese para produção de oligossacarídeos biologicamente ativos, ao conhecimento do papel desempenhado pelos polissacarídeos nos processos de sinalização celular e a busca por novas fontes de biomateriais para ET (KRETZSCHMAR et al., 1995; SUH; MATTHEW, 2000). Dentre os diversos polissacarídeos, a celulose bacteriana (CB) tem sido investigada para uma série de aplicações em ET por possuir propriedades únicas que podem ser alteradas para se adequarem a uma aplicabilidade específica (BACKDAHL et al., 2006; BERTI, 2012; BERTI et al., 2013; CZAJA et al., 2007; FU et al., 2011; KLEMM et al., 2001; RAMBO et al., 2008; RECOUVREUX, 2008; RECOUVREUX et al., 2011; STUMPF et al., 2013).

A CB é um polissacarídeo secretado extracelularmente por bactérias produtoras de celulose, como as do gênero *Gluconacetobacter*, em forma de nanofibras que interconectadas formam uma rede ultrafina, tridimensional e fibrosa (KLEMM et al., 2001; RAMBO et al., 2008). Sua morfologia, combinada com características hidrofílicas, elevado grau de pureza e cristalinidade, biocompatibilidade, boas propriedades mecânicas e durabilidade, fazem dela um material com elevado potencial para o desenvolvimento de dispositivos e produtos com alto valor biotecnológico; no entanto esse potencial ainda deve ser explorado para o sucesso de sua comercialização (CZAJA et al., 2007; SVENSSON et al., 2005; YAMANAKA et al., 1998).

Diversas são as contribuições para exploração do potencial da CB e suas aplicabilidades, bem como a sua produção em escala laboratorial e industrial. O Laboratório de Tecnologias Integradas – InteLab ([www.intelab.ufsc.br](http://www.intelab.ufsc.br)) – da UFSC tem explorado o desenvolvimento e o processo de produção de plataformas de CB em variadas formas, desde a produção em filmes, compósitos, e até estruturas tridimensionais macroestruturadas (*cocoons*), das quais possui registro de patentes, PI08031373-8 e PI0908659-5 (BERTI et al.; PORTO et al., 2008; PORTO et al., 2011; RAMBO et al., 2008; RECOUVREUX et al., 2011; STUMPF et al., 2013). Recentemente, foram produzidos filmes compósitos de CB com concentrações variadas de acemanana, um

polissacarídeo proveniente de *Aloe vera*, através da inserção desse polissacarídeo no meio de produção da CB. Esses filmes foram denominados como biocompósitos de CB-ACE (RECOUVREUX, 2008).

A *A. vera*, popularmente denominada babosa no Brasil, é uma planta utilizada por culturas antigas do Mediterrâneo, China, Egito devido as suas propriedades terapêuticas e medicinais (GRINDLAY; REYNOLDS, 1986; REYNOLDS, 2004; REYNOLDS; DWECK, 1999; YOUNG IN PARK; LEE, 2006). Estudos têm demonstrado as variadas propriedades farmacológicas do extrato do parênquima de reserva desta planta, denominado gel de *A. vera*, correlacionadas com ampla gama de compostos que possuem atividades biológicas benéficas à saúde humana (HAMMAN, 2008). Dentre suas propriedades bioativas pode-se destacar a ação anti-inflamatória, cicatrizante e estimuladora do sistema imune, que aumentam a expressão de citocinas e anticorpos, aumentando a replicação dos fibroblastos em cultura e a fagocitose de macrófagos (CHOW et al., 2005; ZHANG; TIZARD, 1996). Para assegurar a presença dessas atividades no produto final, diversas patentes foram registradas com variadas formas de extração, purificação e manufatura de produtos com propriedades cicatrizantes (BILL H. MCANALLEY, 1990; DANHOF; MCANALLEY, 1983; MCANALLEY, 1987; PORTO et al., 2011).

Logo, o desenvolvimento e a investigação de novos materiais, combinando propriedades de fontes naturais – a exemplo da *A. vera* – com biomateriais, para gerar novos produtos e dispositivos com propriedades físicas, químicas e biológicas adequadas para aplicações em engenharia tecidual e médicas oferecem uma fonte alternativa de terapias e tratamentos de saúde para melhoria da qualidade de vida.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Produzir, através da suplementação *in situ* do meio de cultivo com distintas frações de gel de *A. vera*, e caracterizar plataformas compósitas de celulose bacteriana e *A. vera*.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Extrair e caracterizar três frações distintas, enriquecidas de polissacarídeos, de *A. vera*;

- Modificar, *in situ*, e caracterizar os compósitos à base de CB-Aloe com três diferentes concentrações para cada porção extraída de *A. vera*;
- Avaliar a citotoxicidade das plataformas compósitas desenvolvidas para possíveis aplicações de engenharia de tecidos;
- Analisar o comportamento das células de fibroblasto (L929) cultivadas nos compósitos CB-Aloe;
- Avaliar a capacidade de adesão e a morfologia destes fibroblastos cultivados sobre os compósitos de CB-Aloe sintetizados.



**CAPÍTULO 2**  
**FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**



## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

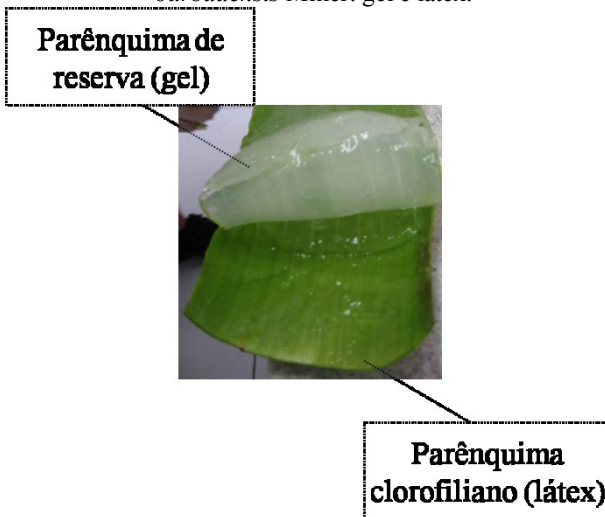
### 2.1 *Aloe vera*

Evidências históricas da utilização da *Aloe* na medicina popular por povos antigos do Mediterrâneo, China, Grécia e Egito foram relatadas em textos antigos do papiro de Ebers e na Bíblia (ARAÚJO et al., 2002; REYNOLDS, 2004; YOUNG IN PARK; LEE, 2006). Existem diversas espécies de *Aloe* e a maioria delas é de origem africana. A *Aloe barbadensis* é originária do Norte da África, ao longo do Nilo, no Sudão, e posteriormente foi introduzida no Mediterrâneo, Índia, Gibraltar, Américas e Ásia (MCANALLEY, 1987; WHO, 1999). Embora seu uso como planta fitoterápica na medicina popular seja conhecido há séculos, o registro da primeira utilização de caráter terapêutico é de 1697. O nome científico *Aloe vera* foi consagrado em 1720 por Carl von Linne, e em 1820 esta planta foi incluída na farmacopéia norte americana como cicatrizante e purgante (ARAÚJO et al., 2002).

Dentre as mais de 360 espécies conhecidas de *Aloe*, apenas três são as mais utilizadas para fins comerciais na indústria farmacêutica, cosmética e, mais recentemente, alimentação funcional. Dessas três espécies, a *Aloe barbadensis* Miller possui o maior valor nutricional e interesse terapêutico (ARAÚJO et al., 2002; BILL H. MCANALLEY, 1988, 1990; KLEIN; PENNEYS, 1988; MCANALLEY, 1987).

Popularmente conhecida como babosa, a *Aloe barbadensis* Miller é uma planta perene pertencente à família Liliaceae. As folhas possuem uma forma côncava na face superior e convexa na inferior, de coloração esverdeada, carnosa, suculenta, e são margeadas por espinhos triangulares curtos e espaçados (GRINDLAY; REYNOLDS, 1986). As folhas possuem dois materiais suculentos: o gel e o látex. Este último é encontrado na casca da folha, denominado de extrato do parênquima clorofílico, que possui coloração amarela, aroma rançoso, consistência leitosa, sabor amargo e é produzido pelas células excretoras do mesófilo (SILVA JÚNIOR, 2003). O gel é extraído do parênquima de reserva, e consiste em uma polpa incolor, viscosa, de sabor levemente amargo e inodoro (TYLER, 1993; WHO, 1999). A Figura 1 mostra as regiões onde os dois materiais suculentos são encontrados.

Figura 1 – Dois materiais suculentos que constituem a folha da *Aloe barbadensis* Miller: gel e látex.



O parênquima de reserva (gel) é constituído substancialmente por 98,5% de água e mais de 200 compostos distribuídos entre polissacarídeos, taninos, enzimas, lipídios, aminoácidos e vitaminas (CHOI; CHUNG, 2003; ESUA; RAUWALD, 2006; WHO, 1999). Dentre eles, os polissacarídeos compõem mais de 60% da fração sólida do gel, no qual os monômeros manose e glicose constituem aproximadamente 70% da porção polissacarídica (ESUA; RAUWALD, 2006; FEMENIA et al., 1999).

A Organização Mundial da Saúde publicou, em seu primeiro volume de monografias sobre plantas medicinais, algumas propriedades farmacológicas do gel de *A. vera*: a aplicação do gel em úlceras, lesões e queimaduras na pele acelera o processo de cicatrização e reduz inflamações agudas (WHO, 1999). Muitas pesquisas têm ressaltado as potencialidades farmacológicas da *A. vera* com componentes isolados a partir do gel, como por exemplo, as propriedades imunoestimulantes, antivirais e anti-inflamatórias que são atribuídas à acemanana, um polissacarídeo incorporado em diversos produtos indicados para cicatrização de lesões, queimaduras, feridas crônicas e úlceras. Segundo esses estudos, o mecanismo de ação da imunoestimulação é descrito através da atividade coadjuvante, na produção de anticorpos específicos e no aumento da expressão de citocinas, que por sua vez aumentam a proliferação de fibroblastos em cultura e estimulam a atividade

fagocítica dos macrófagos (CHOW et al., 2005; ZHANG; TIZARD, 1996). Com o aumento dos fibroblastos o processo de cicatrização de lesões e queimaduras se torna mais rápido. O Quadro 1 correlaciona algumas propriedades farmacológicas do gel de *A. vera* com seus respectivos componentes.

Quadro 1 – Correlação entre alguns dos componentes e as propriedades farmacológicas do gel de *A. vera* .

Componente	Propriedades farmacológicas
Polissacarídeos	Cicatrização; Imunoestimulação; Ação antiviral; Ação anticâncer.
Glicoproteínas	Cicatrização; Proliferação celular; Ação antialérgica.
Fitoesteróis	Angiogênese; Cicatrização; Ação anti-inflamatória.

Fonte: Adaptado de CHOI; CHUNG, 2003

Embora a literatura ressalte as atividades farmacológicas de componentes isolados a partir da *A. vera*, a ação sinérgica de todos os componentes potencializa os efeitos terapêuticos ampliando assim a gama de aplicações medicinais desta planta.

Estudos terapêuticos têm elucidado que o gel desta planta podem produzir efeito de profilaxia em úlceras gástricas nervosas e que administrado conjuntamente com azidotimidina (AZT), protegendo as células da replicação do vírus HIV-1 (REYNOLDS, 2004). Além disso, a administração de gel de *A. vera* em ratos diabéticos, induzido por estreptozotocina, promoveu a redução dos níveis de glicose, colesterol e triglicérides a níveis normais, com a ingestão de 300 mg/kg de gel por 21 dias (RAJASEKARAN et al., 2006). O tratamento de lesões com o gel demonstrou aumento da atividade metabólica e da proliferação dos fibroblastos, como também a produção de colágeno tipo I e III (CHITHRA; SAJITHLAL CHANDRAKASAN, 1998a, b, c; TAKZARE et al., 2009).

Entretanto, a concentração dos componentes com propriedades farmacológicas é variável devido à localização geográfica dos cultivos e às variações sazonais (NI et al., 2004). Campestrini avaliou a influência dos fatores climáticos (insolação, temperatura média mensal,

precipitação pluviométrica e umidade relativa bimestrais) sobre a síntese de polissacarídeos de plantas *Aloe barbadensis* Miller – cultivadas nas acomodações da empresa Naturama - Indústria e Comércio de Produtos Agropecuários Ltda, localizada no município de Paulo Lopes, Santa Catarina. De acordo com esses estudos, o aumento da precipitação pluviométrica e de irradiação solar, entre os meses de agosto a novembro, favorece a produção de polissacarídeos em plantas com idade média de 2 anos. Entretanto, esse conteúdo de polissacarídeos é afetado negativamente quando técnicas de isolamento posteriores à extração, como a diálise, são utilizadas (CAMPESTRINI, 2007).

Além disso, o gel de *A. vera* utilizado por diversas empresas atualmente é obtido através de distintos métodos de extração e estabilização. Estes métodos envolvem a extração do gel através de técnicas de separação por solventes ou por desidratação a baixas temperaturas, não existindo uma padronização metodológica comum. Desta forma o produto final possui concentrações incertas e variáveis de componentes ativos o que compromete a caracterização e o mapeamento das propriedades farmacológicas, principalmente quanto à sua utilização como agente cicatrizante (ROBBERS; SPEEDIE TYLER, 1996).

## 2.2 ENGENHARIA TECIDUAL DE PELE

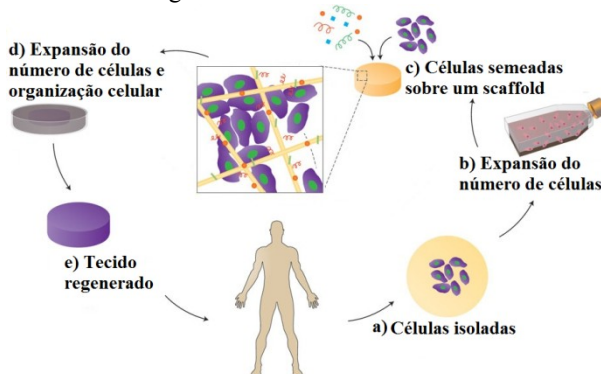
Nas últimas três décadas a regeneração tecidual tem se destacado como uma alternativa para melhorar o tratamento clínico convencional utilizado na medicina. Isto se refere principalmente ao desenvolvimento de técnicas e plataformas baseadas na recuperação das funções biológicas de órgãos e tecidos assim como no auxílio ao tratamento de doenças e traumas.

A recuperação da estrutura física e da função fisiológica de um órgão ou tecido exige o desenvolvimento de estratégias clínicas e materiais inovadores capazes de restabelecer as funções teciduais originais o que envolve um amplo conhecimento de inúmeras áreas de pesquisa (engenharia de materiais, engenharia química, química, medicina, biologia entre outras). A engenharia de tecidos ou engenharia tecidual é uma área da ciência que abrange a aplicação de conhecimentos multidisciplinares no desenvolvimento de produtos inovadores para aplicações na área médica (PALSSON; BHATIA, 2004).

Conceitualmente, os estudos de engenharia de tecidos envolvem o cultivo de células sobre um *scaffold*: um suporte físico, de natureza sintética ou natural, especialmente desenvolvido para mimetizar o

ambiente apropriado e prover o suporte biomecânico inicial para a formação do tecido substituto até a produção de uma matriz extracelular (MEC) adequada pelas células (STOCK; VACANTI, 2001). Esse *scaffold* mimetiza o ambiente 3D de um tecido ou órgão, buscando desta forma compreender a relação que existe entre a fisiologia celular e a disposição da microarquitetura do material. A Figura 2 mostra, de forma resumida, o conceito clássico de engenharia de tecidos no qual as células geralmente são extraídas do próprio paciente e isoladas (a), expandidas em número (b) e semeadas sobre um *scaffold* (c), cultivadas *in vitro* para aumento do número e organização celular (d); posteriormente o tecido regenerado pode ser implantado no local lesionado, incorporando-o no tecido natural (e) (DVIR et al., 2011; STOCK; VACANTI, 2001).

Figura 2 – Conceito de Engenharia de Tecidos



Fonte: Adaptado de DVIR et al., 2011.

Devido à complexidade e à sofisticação dos órgãos e tecidos humanos, a reconstrução estrutural e fisiológica do tecido envolve a utilização de *scaffolds* produzidos de maneira personalizada para atenderem as necessidades do tecido alvo.

As propriedades e características do *scaffold* são otimizadas para guiar as respostas celulares e melhorar a interação de contato célula-*scaffold*, pois as células reconhecem quimicamente a superfície do material e respondem morfológicamente de diversas maneiras à topografia do material, influenciando os eventos celulares de adesão, viabilidade, proliferação e migração (BERTI et al., 2013; BORGES et al., 2013; METCALFE; FERGUSON, 2007b; SALTZMAN; KYRIAKIDES, 2014). Neste contexto, os avanços científicos no desenvolvimento de novos materiais com possíveis aplicações na

engenharia de tecidos têm estimulado pesquisas laboratoriais e clínicas para reconstrução de tecido ósseo, cartilagem, vascularização, reparação da uretra, traquéia, bexiga e regeneração da pele (ATALA; KASPER MIKOS, 2012; JITHENDRA et al., 2013).

O maior órgão do corpo humano, a pele, é constituído pela epiderme e derme, com uma complexa estrutura nervosa e vascular, além das estruturas anexas como os folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, como mostrado na Figura 3. A hipoderme, camada localizada abaixo da derme, é composta por tecido conjuntivo frouxo e tecido adiposo. A ação conjunta dessas três camadas forma uma barreira de proteção do corpo contra o ambiente externo, além de regular a temperatura corpórea, manter a homeostase dos fluidos, detecção sensorial e defesa imunológica. Qualquer perda de integridade da pele compromete a função de proteção e, quanto maior a extensão da área injuriada, mais difícil se torna a regeneração do tecido, podendo resultar na morte do indivíduo (CLARK, 2014).

Queimaduras, doenças crônicas como a diabetes e traumas são algumas das lesões que acometem a pele. Para reparação desse tecido é essencial que os *scaffolds* desenvolvidos apresentem características comparáveis às da pele como propriedades físicas e mecânicas apropriadas, resistência a infecções, baixa antigenicidade, reologia comparável à da pele, presença de componentes dérmicos e epidérmicos, além da facilidade de armazenamento, manuseio e custo/benefício adequado (FERREIRA et al., 2011; METCALFE; FERGUSON, 2007a). Contudo, essas propriedades não garantem a biocompatibilidade do material com o tecido hospedeiro.

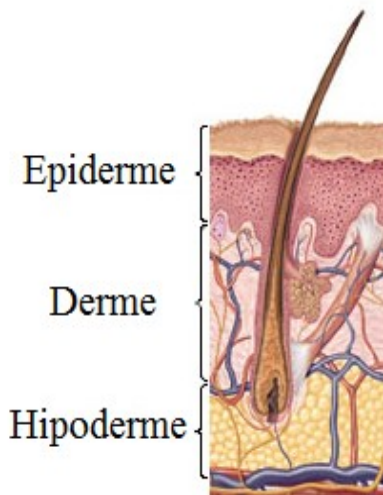
Sendo assim, testes biológicos prévios com os *scaffolds* devem ser realizados utilizando linhagens celulares específicas para restauração da pele, tais como os queratinócitos e fibroblastos, para avaliação de citotoxicidade dos materiais. Os fibroblastos são essenciais para a reparação tecidual, pois executam a síntese e deposição da matriz extracelular, de fatores de crescimento, proliferação e migração celular em resposta quimiotática e moduladora às citocinas, além de auxiliar a proliferação de queratinócitos em materiais potencialmente tóxicos (MACNEIL, 2007; WONG; MCGRATH NAVSARIA, 2007).

Com essa proposta de reparação tecidual, *scaffolds* à base de colágeno (JITHENDRA et al., 2013), quitosana (SILVA; POPA; et al., 2013), alginato (PEREIRA; MENDES BÁRTOLO, 2013) e associação de polímeros para produção de materiais compósitos, como polilactídeo (PLA), carbonato de trimetileno (TMC),  $\epsilon$ -caprolactona (Suprathel<sup>®</sup>) (HIGHTON; WALLACE SHAH, 2013) têm sido produzidos e



comercializados. *Scaffolds* como o Integra<sup>®</sup>, Orcel<sup>®</sup>, Apligraf<sup>®</sup> e Biobrane<sup>®</sup>, à base de colágeno (FERREIRA et al., 2011), são alguns exemplos para substituição cutânea; entretanto, a aplicabilidade destes suportes é limitada, pois possuem custo elevado e também oferecem propriedades mecânicas inferiores às da pele (JITHENDRA et al., 2013).

Figura 3 – Estrutura física da pele.



Fonte: Adaptado de <http://escola.britannica.com.br/article/480867/queimadura>

Os avanços recentes na área de biomateriais têm demonstrado o potencial de diversos *scaffolds* poliméricos no desenvolvimento de novas classes de materiais a partir de modificações químicas e físicas que permitam o controle e o estímulo das reações celulares.

### 2.3 CELULOSE BACTERIANA

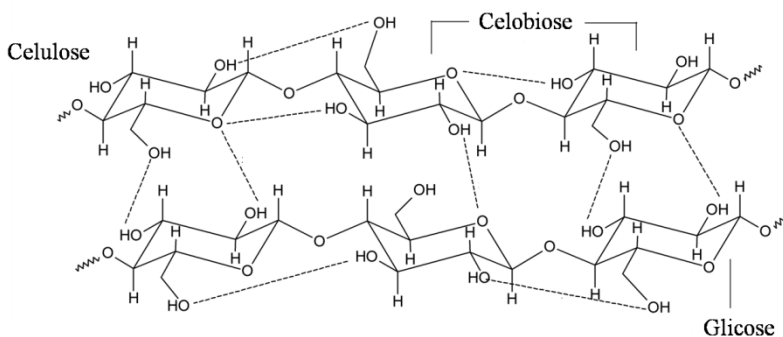
A celulose é o principal constituinte da biomassa vegetal e o mais abundante material biodegradável disponível na natureza sendo também sintetizada por algumas bactérias. Brown reportou, em 1886, a produção de celulose na superfície do meio de cultura, por bactérias do gênero *Acetobacter* na presença de oxigênio e glicose. Mais tarde, esta bactéria do gênero *Acetobacter* foi renomeada para *Gluconacetobacter* e a linhagem *Acetobacter xylinus*, ATCC 23769, foi então reclassificada para *G. hansenii*. A *G. hansenii* é uma bactéria não patogênica,

estritamente aeróbia, Gram negativa, e produz celulose na interface líquido-ar do meio de cultura (BROWN; WILLISON RICHARDSON, 1976; CHAWLA et al., 2009).

A estrutura química da celulose bacteriana é a mesma da celulose vegetal: um homopolissacarídeo linear de fórmula molecular  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , cuja unidade estrutural de repetição, a celobiose, é composta por duas moléculas de glicose unidas através de ligações glicosídicas  $\beta$ -(1→4) (Figura 4). Os grupos hidroxilas formam ligações de hidrogênio intra e intermoleculares responsáveis pela estabilidade química, rigidez da estrutura e formação de fibrilas estáveis, que fazem com que a celulose seja insolúvel em água e em diversos solventes orgânicos. Apesar de a CB apresentar fórmula molecular idêntica à da celulose vegetal, a CB é livre de lignina e hemicelulose, e também não contém componentes de origem animal, portanto, não estimula reações alérgicas; entretanto a CB não é degradada pelo corpo humano devido à ausência da enzima celulase (CHIAOPRAKOBKIJ et al., 2011; HELENIUS et al., 2006; KLEMM, 2005; PECORARO et al., 2008).

Diversas são as propriedades da CB que lhe conferem papel bastante promissor na medicina moderna e nas pesquisas biomédicas em particular. Dentre elas pode-se destacar a estrutura morfológica constituída por nanofibras organizadas em uma rede tridimensional, que lhe determinam propriedades físicas e mecânicas únicas, conferindo elevada cristalinidade (de 60 – 80%), área superficial e hidrofiliabilidade – a CB é capaz de absorver mais de 100 vezes sua massa em água. Sua permeabilidade é caracterizada pela alta porosidade. Todas essas propriedades são influenciadas pelo meio de cultura bacteriano, pelas condições operacionais de cultura, pelo tratamento pós-síntese e pela espécie da bactéria. Além disso, essas mesmas condições variam o rendimento de produção dos exopolissacarídeos insolúveis – CB – e solúveis (acetan) em água. Este último é secretado juntamente com a CB produzida pela bactéria e sua composição química é diferenciada para cada espécie bacteriana. Por exemplo, o acetan produzido pela *G. hansenii*, cultivada em meio manitol, apresentou em sua composição química resíduos de ramnose, manose, ácido glicurônico e glicose. Por outro lado, bactérias *Acetobacter aceti*, cultivadas em meio de batata, produziram acetan composto de ramnose e glicose (MOONMANGMEE et al., 2002; VALEPIN; BEREZINA PAQUOT, 2012). É pouco provável que o isolamento do acetan da CB seja economicamente viável; entretanto, a presença desse exopolissacarídeo na CB pode ser significante no desempenho funcional para o qual a CB será destinada (ROLLER; DEA, 1992).

Figura 4 – Representação da estrutura química da celulose e as ligações de hidrogênio inter e intramoleculares



Fonte: Adaptado de <http://intechopen.com/source/html/45443/media/image1.png>

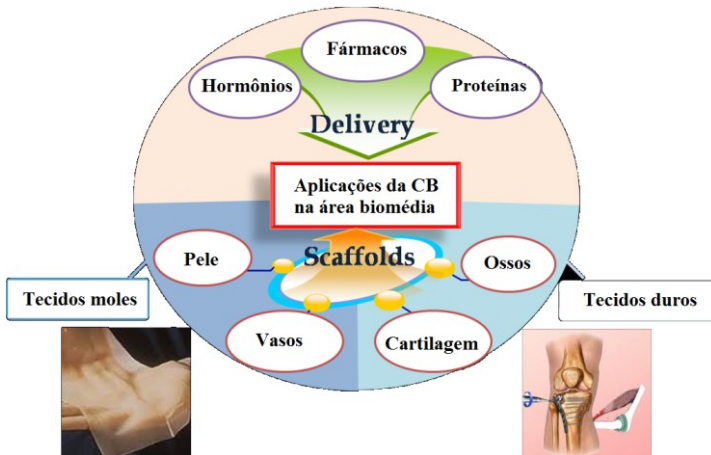
Dessa forma é possível aprimorar e adaptar as características da CB para uma aplicação específica através de variações na composição do meio de cultura, no pH, na temperatura, no tempo de fermentação e também por modificações químicas (IGUCHI; YAMANAKA BUDHONO, 2000; KLEMM et al., 2005; UL-ISLAM, M.; KHAN, T. PARK, J. K., 2012).

Diversos trabalhos têm enfatizado o desenvolvimento de novos dispositivos biomédicos e suas aplicações utilizando a CB para: regeneração de tecidos cartilagosos, tecidos curativos temporários, implantes dentários, implantes vasculares, substituição de menisco, sistema de liberação de fármacos, revestimentos de *stents*, uretra, válvula cardíaca, regeneração óssea, dispositivos para liberação controlada de fármacos, hormônios e proteínas (Figura 5).

A biocompatibilidade *in vivo* de membranas à base de CB, aplicadas em lesões cutâneas, evidenciou que as dimensões da lesão contraíram mais rapidamente com tratamentos à base de CB do que quando produtos atualmente disponíveis no mercado foram utilizados para esta aplicação. Helenius e colaboradores (2006) demonstraram que houve integração total da CB ao tecido subcutâneo do hospedeiro sem a indução de processos inflamatórios e sem rejeição ao longo do tempo após implante. Além disso, as potencialidades dos biomateriais de CB têm sido exploradas em variados formatos para aplicações específicas: tubos para vasos sanguíneos artificiais (BASYC<sup>®</sup>), membranas para pele artificial temporária, tratamento de lesões crônicas (Biofill<sup>®</sup>, XCell<sup>®</sup>, Bionext<sup>®</sup>), reconstrução de tecidos periodontais (Gengiflex<sup>®</sup>), máscara

cosmética (BioCellulose®) e agentes bactericidas (BARUD et al., 2011; BEL MONDO BEAUTY, 2014; CZAJA et al., 2007; FU; ZHANG YANG, 2013; HELENIUS et al., 2006; KLEMM et al., 2001; LIN et al., 2013; SASKA et al., 2011; SVENSSON et al., 2005; WIPPERMANN et al., 2009).

Figura 5 – Versatilidade das aplicações biomédicas de materiais a base de celulose bacteriana.



Fonte: Adaptado de FU et al. 2011.

Embora o potencial de aplicações da CB seja bastante amplo, a existência de poucos produtos à base de CB para algumas aplicações biomédicas exprime a necessidade de avanços desde a otimização dos processos fermentativos até os testes pré-clínicos e clínicos para consagração de sucesso deste biomaterial no mercado.

## 2.4 MODIFICAÇÕES E APLICAÇÕES DA CELULOSE BACTERIANA

A potencialidade da CB no desenvolvimento de novos dispositivos biomédicos se deve ao fato de este material ser bastante versátil no que se refere à dinâmica do processo de produção das estruturas poliméricas. Desta forma uma simples alteração no método de síntese da CB pode proporcionar a obtenção de um biomaterial com designs variados sendo devidamente projetado para a aplicação desejada.

A simples introdução de outras fontes de carbono pode alterar de maneira significativa a microarquitetura da CB. O enriquecimento do meio de cultura com glicose (CBGl) ou dextrina (CBDe) foi avaliado no Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab/UFSC). A introdução desses sacarídeos no meio não produziu nenhuma alteração química; no entanto, reduziu a área superficial, a capacidade de absorção de água e a taxa de reidratação das membranas. A porosidade variou ao longo de sua estrutura, sendo que a CBDe apresentou a menor porosidade para ambas superfícies e região interna. As análises *in vitro*, com fibroblastos de ratos, demonstraram que as células interagiram mais fortemente com a membrana CBl, evidenciada pelo alongamento do citoesqueleto e maior proliferação celular em 72 horas. Embora os estudos tenham sido limitados, foi sugerido que a melhor interação célula-CBl ocorreu pela influência da porosidade e da rugosidade do material (STUMPF et al., 2013).

Membranas porosas foram produzidas acrescentando nanopartículas de hidroxiapatita e carboximetilcelulose (para evitar a sedimentação das nanopartículas e controlar a viscosidade do meio) no meio de cultura da CB (*in situ*). O material resultante apresentou fibras com diâmetros até 50% menores que a CB sem modificações, poros com dimensões até 47% maiores e maior cristalinidade. Todas essas modificações foram atribuídas à ligação química entre os compostos que proporcionaram a estabilização do nanocompósito. Essas alterações demonstraram a ótima biocompatibilidade evidenciada pelo aumento da viabilidade celular das células embrionárias de rim humano (HEK) (GRANDE et al., 2009). Membranas e tubos de CB foram produzidas, *ex situ*, com hidroxiapatita para aplicações na regeneração de tecidos ósseos. Esses materiais revelaram a potencialidade desses *scaffolds* para esta aplicação, aumentando a aderência e a confluência de células osteoprogenitoras sobre a superfície (ZIMMERMANN et al., 2011). Compósitos multicamadas de CB e hidroxiapatita (HCB-HAp) foram produzidos com sucesso no InteLab, objetivando aplicações em engenharia de tecidos ósseos (RECOUVREUX, 2008).

Lin e colaboradores (2013) produziram compósitos de CB-quitosana (CB-Ch) com aplicabilidade na cicatrização de lesões cutâneas. Estes pesquisadores revelaram que os compósitos CB-Ch possuem uma estrutura mais compacta com menor diâmetro de poros, um aumento no módulo de elasticidade e redução na capacidade de absorção de água atribuída à interação entre a quitosana e as fibras de CB. A biocompatibilidade destas membranas foi testada *in vitro*, com fibroblastos cutâneos de ratos, e *in vivo*, com lesões de 1,44 cm<sup>2</sup> no

dorso de ratos. Apesar dos estudos *in vitro* não revelarem resultados promissores, os estudos *in vivo* demonstraram que a aplicação dos compósitos de CB-Ch sobre a lesão cutânea contraiu mais rapidamente as dimensões da área lesionada quando comparados com o produto disponível comercialmente Tegaderm™ (LIN et al., 2013).

Espônjas compósitas de CB-alginato, em cinco concentrações diferentes, foram produzidas por liofilização. Apenas a esponja compósita de CB-alginato 70/30% (m/m) apresentou estabilidade (i.e., manteve sua estrutura quando imersa em PBS por 48 horas) e propriedades mecânicas adequadas, que permitem que ela seja suturada em seu estado hidratado, para aplicações na regeneração de tecidos periodontais. Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que esse biomaterial suporta a proliferação de queratinócitos humanos e fibroblastos gengivais (CHIAOPRAKOBKIJ et al., 2011).

Pértile e colaboradores (2010) submeteram membranas de CB ao tratamento com plasma de nitrogênio para modificar a superfície da CB quimicamente, incorporando grupos nitrogênio, e morfológicamente, aumentando a porosidade. Sobre essas membranas modificadas foram cultivados fibroblastos, neuroblastos e células endoteliais, as quais demonstraram boa afinidade celular, pelo aumento da viabilidade, em até 48 horas de cultura (PERTILE et al., 2010).

A inserção de *A. vera* no meio de cultura da CB também produziu modificações químicas de interesse para engenharia de tecidos. Saibuatong e Phisalaphong (2010) variaram a suplementação de gel de *A. vera* no meio de cultura, de 5 a 50% (v/v), da bactéria *Gluconacetobacter xylinus* para produção de compósitos à base de celulose bacteriana e *Aloe vera* (CB-Aloe) e avaliaram as modificações químicas, morfológicas e mecânicas do material. Segundo seus estudos, a *A. vera* foi incorporada na membrana de CB com sucesso, evidenciada por interações intra e/ou intermoleculares encontradas nos espectros de FTIR. Além disso, a concentração ótima (30% de suplementação do meio de cultura com gel de *A. vera*) foi capaz de aumentar as propriedades mecânicas da CB-Aloe, capacidade de absorção de água, cristalinidade e diâmetro dos poros do biomaterial formado (SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010). Entretanto estudos *in vitro* não foram realizados com esses compósitos tão pouco com diferentes porções extraídas do gel de *A. vera*.

Nesta dissertação, o meio de cultura de produção das membranas de CB foi suplementado com três frações extraídas das folhas de *A. vera* em concentrações variando de 20% a 60% (v/v). O compósito formado foi caracterizado e foram avaliadas as características dos fibroblastos

L929 em função da modificação da CB. A citotoxicidade foi analisada seguindo as normas preestabelecidas pela ISO 10993-5 para avaliação biológica de dispositivos médicos de acordo com os testes de citotoxicidade *in vitro* com a linhagem L929. Estes resultados serão apresentados nos próximos capítulos.





### **CAPÍTULO 3** EXTRAÇÃO DE DIFERENTES FRAÇÕES DE POLISSACARÍDEOS DE *Aloe vera*

Neste capítulo será avaliado o rendimento de três porções separadas do gel de *A. vera*, a influência do tratamento térmico de esterilização sobre os principais grupos funcionais e a microestrutura das porções após o tratamento térmico.



# 3EXTRAÇÃO DE DIFERENTES FRAÇÕES DE POLISSACARÍDEOS DE *Aloe vera*

## 3.1 INTRODUÇÃO

A *A. vera* tem sido utilizada frequentemente como aditivo de alimentos funcionais e bebidas em função da sua composição química que engloba uma grande quantidade de substâncias biologicamente ativas. Estas substâncias ativas da *A. vera* são capazes de manter o equilíbrio de açúcar no sangue e reduzir as taxas de colesterol/triglicerídeos, auxiliar na digestão, imunoestimulação, prevenção de pedras nos rins e desintoxicação (GRUENWALD, 2009).

Para que as propriedades bioativas das folhas da *A. vera* sejam asseguradas no produto final (gel de *A. vera*), o processamento industrial desta planta deve manter o controle da qualidade físico-químico e bioativo do gel. Nos Estados Unidos, esse controle industrial foi um grande problema até o início dos anos 90. Em 1983, a organização “International Aloe Science Council – IASC” estabeleceu o programa de controle de qualidade, como certificação de autenticidade, de produtos à base de gel de *A. vera*. Entretanto, este programa definiu somente parâmetros físico-químicos e estava baseado em análises antiquadas para a maioria desses produtos. Entre 1991 e 1993, a “Aloe Research Foundation – ARF” padronizou os principais marcadores de atividade biológica e os ensaios para identificação desses componentes nos produtos à base de *Aloe. sp.* A correlação entre estes dois programas forneceu algumas resoluções importantes que impulsionaram o desenvolvimento dos programas de processamento e qualidade de produtos à base de *A. vera* (REYNOLDS, 2004).

Segundo a literatura, o processamento de folhas de *A. vera* pode ser separado em três etapas principais (MCANALLEY, 1987; REYNOLDS, 2004):

- a) Processamento preliminar – Consiste na coleta, limpeza, sanitização, remoção da casca das folhas e a trituração da polpa da planta;
- b) Processamento intermediário – Abrange a redução dos microrganismos, o controle microbiológico e físico-químico, a estabilização e ainda descoloração do gel;
- c) Processamento final – Envolve os métodos de concentração e secagem do produto final.

A falta de cuidados em cada uma das etapas pode comprometer significativamente o rendimento e a qualidade do produto final a ser comercializado. A proliferação excessiva de bactérias nativas da flora desta planta, o aparecimento de fungos ou outras bactérias, o surgimento da coloração vermelha, ou marrom, derivados da oxidação de antraquinonas são alguns exemplos de contaminação que podem afetar toda a produção (REYNOLDS, 2004).

A redução dos microrganismos, em escala industrial, presentes no gel geralmente é realizada por pasteurização, em temperaturas que variam de 65°C até 150°C, apesar de estudos revelarem a diminuição do teor de polissacarídeos de alto interesse, como a acemanana, no produto final (FEMENIA et al., 2003; FEMENIA et al., 1999; REYNOLDS, 2004; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2011; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2012). Em escala laboratorial, a filtração por membrana é bastante utilizada para volumes de 1 a 2 mL. No entanto, essa atividade se torna inviável para volumes maiores, já que para “quebrar” a plasticidade do gel seria necessário passar o material por uma série de filtragens reduzindo gradualmente o diâmetro dos poros das membranas. Além da temperatura, a exposição à luz e ao oxigênio também são fatores a serem controlados para evitar alterações indesejáveis no gel (REYNOLDS, 2004; YOUNG IN PARK; LEE, 2006).

Os parâmetros físico-químicos do gel são geralmente determinados pelo conteúdo de sólidos, a quantificação de cálcio, magnésio, identificação de ácido málico e o teor de polissacarídeos. Algumas das técnicas utilizadas para identificação e quantificação desses parâmetros são: a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrometria de emissão atômica (ICP-AES), de ressonância magnética nuclear de próton ( $^1\text{H}$  NMR) e de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Como essas técnicas apresentam um custo significativo para a indústria, geralmente são realizadas em laboratórios associados (REYNOLDS, 2004).

Diversos estudos foram publicados utilizando essas técnicas e outras mais sofisticadas, para caracterização de uma variedade de polissacarídeos isolados a partir do gel de *A. vera*. Campestrini (2007) e Gonçalves (2008) realizaram estudos envolvendo a extração, isolamento e a caracterização de uma fração do gel de *A. vera* insolúvel em etanol, com teor enriquecido de polissacarídeos, de interesse comercial para indústria farmacêutica, a partir de plantas cultivadas pela Naturama Indústria e Comércio de Produtos Agropecuários Ltda (CAMPESTRINI, 2007; GONÇALVES, 2008). Recentemente, uma

glicomanana parcialmente acetilada, isolada desta mesma fração, foi caracterizada química e reologicamente por Campestrini (CAMPESTRINI et al., 2013).

Neste capítulo, será avaliado o rendimento de três porções extraídas do gel de *A. vera*, a influência do tratamento térmico e mecânico na variação dos principais grupos funcionais e na microestrutura das frações.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 Aquisição da matéria prima vegetal

As folhas de *Aloe barbadensis* Miller foram coletadas nas instalações da empresa Naturama Indústria e Comércio de Produtos Agropecuários Ltda, situada no município de Paulo Lopes, Santa Catarina, cuja plantação é mostrada na Figura 6. As plantas selecionadas tinham faixa de idade variável e, logo que coletadas, seguiram para o Laboratório de Tecnologias Integradas – InteLab, no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina – para posterior processamento e obtenção do gel e extração da fração polissacarídica.

Figura 6 – Plantação de *Aloe barbadensis* Miller nas instalações da empresa Naturama - Indústria e Comércio de Produtos Agropecuários Ltda, em Paulo Lopes, Santa Catarina.



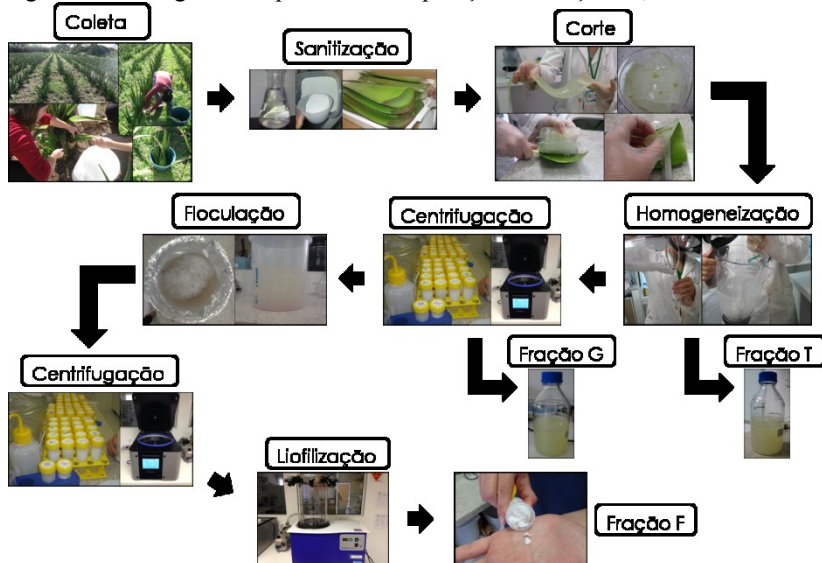
### 3.2.2 Obtenção da fração polissacarídica insolúvel em etanol (F), do gel de *A. vera* homogeneizado e centrifugado (G) e do gel de *A. vera* homogeneizado contendo fibras (T)

O tratamento das folhas foi iniciado no Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab/UFSC) com a lavagem das folhas em água corrente, seguida pela sanitização com uma solução de hipoclorito de cálcio (0,125g/L), por 5 minutos. Logo após, as folhas foram lavadas

com água destilada para a retirada do excesso da solução anteriormente utilizada (MCANALLEY, 1987). Foi então realizado o processo de separação da casca, iniciando com um corte transversal na porção basal das folhas, de aproximadamente 1 cm de comprimento, e na porção apical, de aproximadamente 10 cm. Após esta etapa, foi separada a casca da porção interna, através de cortes longitudinais na epiderme da folha (CAMPESTRINI, 2007). O gel interno foi homogeneizado, em um liquidificador (Phillips Walita®, modelo RI2044/60), por 3 minutos à temperatura ambiente.

Uma fração do gel homogeneizado contendo fibras foi separada e denominada fração T, conforme mostra a Figura 7. A outra porção restante foi depositada em frascos apropriados, para a separação das fibras através de centrifugação, utilizando uma centrífuga (Centurion Scientific, modelo K3 com o rotor BRK5308) durante 15 minutos a  $3300\times g$ , à temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$ . Logo após, o gel foi depositado em frascos apropriados. Novamente uma fração foi separada e denominada de fração G. A porção restante seguiu para a etapa de extração alcoólica.

Figura 7 – Fluxograma do processo de separação das frações T, G e F.



A extração da fração polissacarídica (F) foi realizada à temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ), com a proporção de 1 volume de gel para 6 volumes de etanol 96%, ao abrigo de luz e em condições estáticas

durante 24 horas (CAMPESTRINI, 2007; GONÇALVES, 2008). Após este período, houve a formação de um material floculado branco, que foi separado e centrifugado nas mesmas condições anteriormente citadas. A solução alcoólica foi descartada e o “pellet” branco foi adicionado a um volume de água destilada suficiente para cobrir o “pellet” formado. Posteriormente essa solução foi autoclavada e liofilizada. Após a liofilização a amostra ficou estocada em um dessecador até sua utilização.

### 3.2.3 Caracterização das frações extraídas de *Aloe vera*

3.2.3.1 Rendimento da fração polissacarídica insolúvel em etanol (fração F), do gel de *A. vera* homogeneizado e centrifugado (fração G) e do gel de *A. vera* homogeneizado contendo fibras (fração T)

As massas secas das frações T, G e F, obtidas através da extração descrita na seção 3.2.2, foram utilizadas para determinação do rendimento das amostras em relação à massa úmida de parênquima, para determinação da fração T. A massa seca da fração T foi utilizada para determinação do rendimento da fração G. A massa seca da fração G foi utilizada para o rendimento da fração F. A determinação foi realizada através das equações 1, 2 e 3:

$$\text{Rendimento de T} = \frac{m_{\text{seca de T}}}{m_{\text{fresca de parênquima}}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Rendimento de G} = \frac{m_{\text{seca de G}}}{m_{\text{seca de T}}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{Rendimento de F} = \frac{m_{\text{seca de F}}}{m_{\text{seca de G}}} \times 100\% \quad (3)$$

As massas secas das frações T e G foram obtidas através da liofilização do gel homogeneizado de *A. vera* com 7 folhas (para cada amostra) que foram processadas em até 24 horas após a colheita para evitar oxidação.

3.2.3.2 Espectroscopia de infravermelho por refletância total atenuada (FTIR-ATR)

As amostras das frações F, G e T foram liofilizadas (por 24 horas) e analisadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier realizada no instrumento modelo TENSOR 27 (Bruker,

Alemanha) equipado com cristal de ZnSe utilizado para refletância total atenuada (ATR). Os espectros das amostras foram registrados em uma faixa de 4000-600  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e acúmulo de 16 varreduras.

### 3.2.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise da microestrutura uma alíquota de cada amostra (frações F, G e T) autoclavada (e uma amostra de G não autoclavada -  $G_L$ ) foi congelada a - 80 °C, por aproximadamente 24 horas, e posteriormente liofilizadas, em um liofilizador modelo L101 (LIOBRAS, Brasil), por 24 horas. A análise foi realizada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) a uma tensão de 10 kV, para as amostras das frações T, G e  $G_L$ , no LCME-UFSC (Jeol 6390 LV, JEOL Ltd., Tóquio, Japão), e F no ECM/LabMat-UFSC (MEV, Philips, XL-30).

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato do parênquima de reserva da *A. vera* é composto por um alto teor de água, variando entre 98,5% a 99% de sua massa *in natura* (FEMENIA et al., 1999; HENRY, 1979; PARKS; ROWE, 1941). É importante ressaltar que como o material utilizado trata-se de uma planta, as condições de cultivo, a localização geográfica, o período do ano de colheita e a genética da planta são alguns dos fatores que influenciam no teor de polissacarídeos e açúcares solúveis (REYNOLDS, 2004). Conseqüentemente, o rendimento das frações T, G e F também é afetado, além dos fatores já citados, pelas técnicas de extração e separação utilizadas. A tabela 1 resume os dados médios das massas secas de T, G e F, bem como o rendimento destes, em plantas coletadas em agosto de 2012.

Tabela 1 – Parâmetros de rendimento em massa seca das frações T, G e F. Dados representados com a média  $\pm$  EPM.

Parâmetros	Dados
Massa seca da fração T (g)	4,75 $\pm$ 0,33
Massa seca da fração G (g)	3,93 $\pm$ 0,37
Massa seca da fração F (g)	0,61 $\pm$ 0,05
Rendimento da fração F (%)	16,10 $\pm$ 2,12



A fração T apresentou rendimento de aproximadamente 1,25% de massa seca do extrato úmido de parênquima da planta. Dessa porção, 82,73% se resumiram em massa seca de G, do qual foi possível separar 16,10% de F. Os dados de rendimento em base seca de T e G apresentaram semelhança com aqueles publicados previamente por Ni e colaboradores (2004), de 0,9% e 83,1% de massa seca de T e G respectivamente (NI *et al.*, 2004), provenientes de plantas cultivadas na Califórnia, Estados Unidos. Além disso, estudos prévios realizados com *Aloe barbadensis* Miller (em diferentes períodos do ano), cultivada pela Naturama, estimaram que cerca de 70% da massa seca da fração F é composta por polissacarídeos e que a presença de proteínas varia de 9% a 12% (CAMPESTRINI, 2007; GONÇALVES, 2008).

A identificação dos grupos funcionais predominantes nas frações T, G e F foi realizada através do perfil dos espectros de FTIR-ATR mostrados na Figura 8. As atribuições das bandas principais destes espectros estão resumidas na Tabela 2.

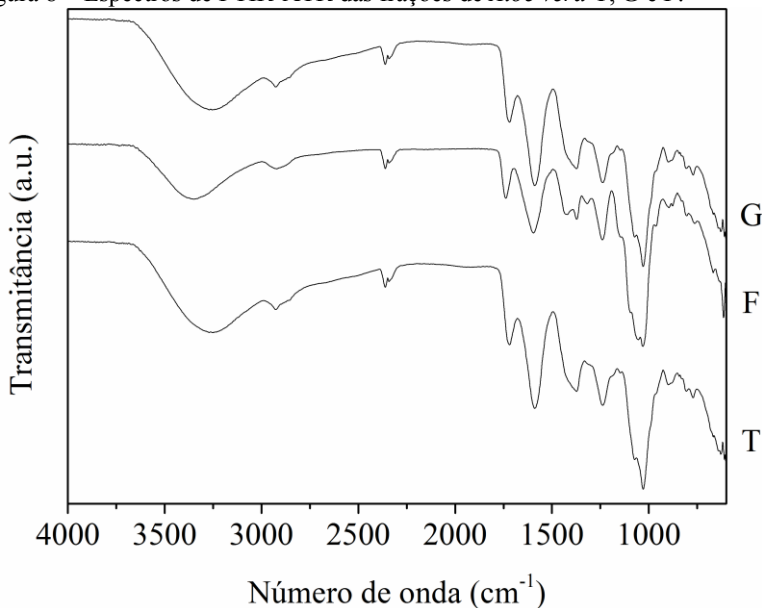
De acordo com os perfis dos espectros e os dados da Tabela 2 é possível visualizar que as frações T e G são bastante similares. No entanto, quando os espectros dessas amostras são comparados ao da fração F, observa-se que existem diferenças entre algumas bandas.

A banda na região de  $3350\text{ cm}^{-1}$ , presente nos espectros das frações T, G e F, é atribuída às interações de hidrogênio intra e intermolecular (ABIDI; CABRALES HAIGLER, 2014; OH *et al.*, 2005). É possível observar um pequeno deslocamento na região de  $1700\text{ cm}^{-1}$ , referente à ligação C=O de ácido carboxílico (substâncias pécnicas) ou de éster (hemicelulose) para a porção F (CÉLINO *et al.*, 2014). Esses deslocamentos, assim como a definição de algumas bandas no espectro da fração F, sugerem que houve a solubilização de alguns compostos durante o processo de extração alcoólica.

As bandas de  $1595$  e  $1589\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas por alguns autores às deformações axiais, estiramento das ligações C–H e C=C provenientes da presença de lignina (CÉLINO *et al.*, 2014; COLOM *et al.*, 2003). No entanto, Saibuatong e colaboradores (2010) atribuíram estas bandas à presença de grupos amina da *A. vera*. Grupos  $\text{NH}_2$  associados a carbonilas apresentam bandas características nas regiões  $1720\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ , referentes às deformações axiais de C=O de amidas primárias, e  $1600\text{--}1480\text{ cm}^{-1}$ , deformações axiais de N–H de amidas secundárias (DÉLÉRIS; PETIBOIS, 2003; PETIBOIS *et al.*, 2001). Todavia, devido à complexidade das porções, diversos grupos funcionais podem apresentar sobreposição de bandas dificultando a sua identificação e, por esta razão, é plausível que ambas as atribuições

estejam coerentes. A identificação de forma concisa dos grupos funcionais necessita da realização de um processo de isolamento prévio dos componentes, antes de sua identificação definitiva.

Figura 8 – Espectros de FTIR-ATR das frações de *Aloe vera* T, G e F.



A fração F apresenta três bandas em 1427, 1319 e 1146  $\text{cm}^{-1}$ , relacionadas à presença de celulose e outros polissacarídeos (ABIDI; CABRALES HAIGLER, 2014; CÉLINO et al., 2014; MOVASAGHI; REHMAN UR REHMAN, 2008). A esses mesmos compostos foi atribuída a banda em 1074  $\text{cm}^{-1}$  nos espectros das frações T e G.

As bandas na região de 899 e 897  $\text{cm}^{-1}$  são referentes à presença de  $\beta$ -anômeros de anéis piranosídicos, como  $\beta$ -D-manose e  $\beta$ -D-glicose (KAČURÁKOVÁ et al., 2002).

Esses espectros apresentaram semelhança com outros já relatados em estudos anteriores realizados na produção de um insumo farmacêutico à base de polissacarídeos de *A. vera* e da fração polissacarídica de plantas micropropagadas e plantas do campo (CAMPESTRINI, 2007; GONÇALVES, 2008).

Tabela 2 – Atribuições das bandas dos espectros de FTIR-ATR das frações T, G e F.

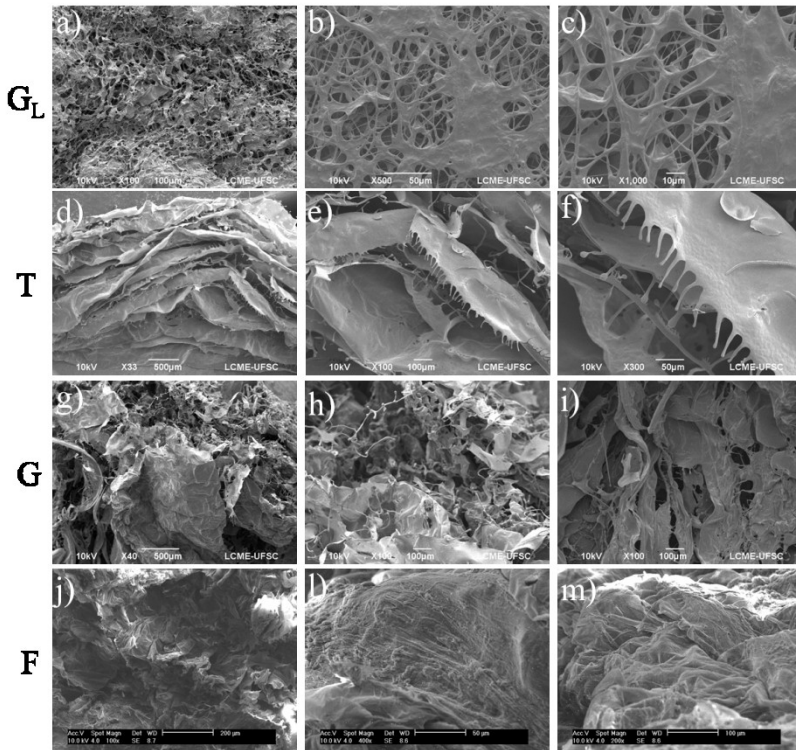
Atribuição	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )			Referências
	G	F	T	
v(O–H)	3254	3350	3254	(ABIDI; CABRALES HAIGLER, 2014; KNILL, 2000; OH et al., 2005)
v(C–H)	2926	2922	2926	(MULLER et al., 2011; YANG et al., 2005; YI et al., 2012)
v(C=O)	1720	1738	1720	(CÉLINO et al., 2014; KACURAKOVA et al., 2002; PETIBOIS et al., 2001)
v(C–H), v(C=C), N–H	1589	1595	1589	(ARTZ et al., 2008; CÉLINO et al., 2014; LAMMERS; ARBUCKLE-KEIL DIGHTON, 2009; SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010)
δ <sub>as</sub> (CH <sub>2</sub> )	-	1427	-	(MOVASAGHI; REHMAN UR REHMAN, 2008)
δ(O–H), v(C–H)	1373	1373	1373	(BOERIU et al., 2004; KACURÁKOVÁ et al., 2002)
δ <sub>s</sub> (CH <sub>2</sub> )	-	1319	-	(ABIDI; CABRALES HAIGLER, 2014; CÉLINO et al., 2014)
v(C–O)	1238	1240	1238	(KAČURÁKOVÁ et al., 2002)
v(C–O–C)	-	1146	-	(KACURAKOVA et al., 2000)
v(C–O),	1074	-	1074	(KAČURÁKOVÁ et al., 2002)
v(C–C)	1028	1030	1028	(KAČURÁKOVÁ et al., 2002)
δ(C–H)	899	897	899	(KAČURÁKOVÁ et al., 2002)

v = deformação axial, δ = deformação angular. Subíndices: s = simétrico, as = assimétrico

As microestruturas do gel de *A. vera* antes do tratamento térmico (G<sub>L</sub>) e das frações T, G e F, avaliadas através de MEV, estão apresentadas na Figura 9.

Figura 9 – Microestrutura das porções autoclavadas G, F e T.

Magnificações de a) 100×, b) 500×, c) 1000×, d) 40×, e) 100×, f) 200×, g) 100×, h) 200×, i) 400×, j) 33×, l) 100× e m) 500×.



Como mostrado nas micrografias,  $G_L$  evidencia uma microestrutura mais ordenada e aparentemente rígida, ao contrário, as três porções demonstram características microestruturais irregulares e amorfas.

Ray *et al.* (2013), Miranda *et al.* (2010) e Rodríguez-González *et al.* (2011) publicaram estudos relacionados às alterações microestruturais ocasionadas por diferentes métodos de tratamento térmico com o gel de *A. vera*. De acordo com suas publicações, o material *in natura* de *A. vera* exibe uma estrutura bastante organizada, de fácil visualização das formas arredondadas das células do parênquima, com diâmetros característicos de 300 a 400  $\mu\text{m}$ . Conforme a técnica de tratamento térmico utilizada, o tecido perde sua integridade, apresentando características amorfas (MIRANDA *et al.*, 2010; RAY *et*

*al.*, 2013; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2011). Essa mesma alteração foi identificada para amostra da fração G e também pode ser estendida para fração T, por se tratarem de amostras semelhantes. No entanto, a literatura não relata caracterização para a fração F.

Sendo assim, o tratamento térmico por autoclavagem altera a integridade das porções de *A. vera* conferindo características amorfas às porções.

### 3.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Os rendimentos, em base seca, das três frações estudadas apresentaram compatibilidade com dados previamente publicados na literatura.

As alterações observadas na microestrutura em virtude do tratamento térmico de esterilização, por autoclavagem, corroboram com dados já publicados para tratamentos como pasteurização e secagem, evidenciando que após o tratamento térmico as frações apresentam características amorfas.

Mesmo após o tratamento térmico de esterilização (autoclavagem) e liofilização, os principais grupos funcionais presentes na fração F apresentaram resultados semelhantes a outros obtidos em estudos prévios e com as amostras das frações T e G, conforme identificados pelos perfis dos espectros de FTIR-ATR.

Entretanto, essa técnica fornece apenas informações qualitativas das amostras, não sendo possível aferir as possíveis alterações de substâncias bioativas devido à complexidade de componentes presentes na *A. vera*. Para identificação das substâncias bioativas e a relação entre o tratamento térmico e as alterações nas atividades biológicas dessas substâncias maiores estudos devem ser conduzidos. Contudo, este fato pode justificar eventual perda de propriedades terapêuticas em compósitos formulados com essas frações, caso em que alternativas de esterilização (não térmica) deveriam ser avaliadas.



## **CAPÍTULO 4**

### **HIDROGÉIS DE CELULOSE BACTERIANA INCORPORADOS COM FRAÇÕES DE *Aloe vera***

Neste capítulo serão discutidas as modificações das propriedades mecânicas, físico-químicas e microestruturais ocasionadas pela incorporação de *A. vera* na síntese *in situ* de plataformas compósitas CB-Aloe. Os resultados obtidos quanto à avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos biomateriais sintetizados também serão apresentados.





## 4 HIDROGÉIS DE CELULOSE BACTERIANA INCORPORADOS COM PORÇÕES DE *A. vera*

### 4.1 INTRODUÇÃO

O tratamento de grandes ferimentos de pele causados por queimaduras, lesões crônicas ou traumas é um grande desafio para a área médica, pois a utilização de enxertos não é eficaz para restabelecer as funções fisiológicas e estruturais da pele. Uma das estratégias da engenharia de tecidos é o desenvolvimento de materiais biocompatíveis com propriedades físico-químicas e mecânicas apropriadas para cada aplicação. O sucesso destes biomateriais, denominados *scaffolds* está relacionado à construção de uma microestrutura capaz de mimetizar o microambiente da lesão favorecendo a adesão, crescimento e a migração das células que compõem o tecido ou órgão (BERTI et al., 2013; DRURY; MOONEY, 2003; TABATA, 2009). Avanços recentes têm elucidado a aplicação potencial de materiais à base de polissacarídeos, como a CB, não apenas para a restauração estrutural e fisiológica da pele, mas envolvendo a regeneração da cartilagem, ossos e tecidos moles do corpo (CZAJA et al., 2006; FONTANA et al., 1990; RECOUVREUX et al., 2011; SVENSSON et al., 2005; ZABOROWSKA et al., 2010).

A CB é um polímero secretado extracelularmente por bactérias produtoras de celulose, como a *G. hansenii*, na forma de microfibrilas constituídas por unidades de glicose ( $\beta$ -D-glicose), organizadas linearmente, unidas por ligações  $\beta(1\rightarrow4)$ . Em especial, sua estrutura tridimensional, biocompatibilidade e alto teor de hidratação fornecem as condições favoráveis para sustentar a regeneração tecidual, com um mínimo de efeitos indesejáveis depois de implantada (CZAJA et al., 2006; HELENIUS et al., 2006). É um material atrativo que pode ser produzido com baixo custo, utilizando diversas fontes de carbono, em variados tamanhos e formatos, com propriedades estruturais e mecânicas únicas e altamente versáteis (CARREIRA et al., 2011; FU et al., 2011; HONG; QIU, 2008; KLEMM et al., 2001).

Como um material versátil, a CB pode ser modificada e/ou aprimorada para se adequar a uma aplicabilidade específica em um tecido alvo. Para aplicabilidade de regeneração de pele as modificações microestruturais, mecânicas e capacidade de absorção de água podem ser alcançadas através da suplementação do meio de cultura base da CB com outras fontes de carbono (STUMPF et al., 2013; UL-ISLAM et al., 2013). Além disso, a imobilização de fatores de crescimento celular,

incorporação de diferentes tipos de materiais naturais (colágeno, fibronectina, elastina, ácido hialurônico, entre outros) na CB (LIN et al., 2011) e a produção de materiais compósitos com nanopartículas de prata, quitosana, alginato e *A. vera* podem aumentar a afinidade celular e agregar outras atividades biológicas como, por exemplo, as ações antimicrobiana e anti-inflamatória (CHIAOPRAKOBKIJ et al., 2011; LIN et al., 2013; MANEERUNG; TOKURA RUJIRAVANIT, 2008; SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010).

*A. vera* possui uma ampla gama de atividades biológicas benéficas à saúde humana devido à complexa combinação de compostos presentes no seu gel interno. Uma das principais aplicações deste estudo é o desenvolvimento de um material CB-Aloe que seja capaz de regenerar a pele sem estimular processos inflamatórios relacionados à toxicidade do biomaterial. A presença do gel *A. vera* pode favorecer a regeneração da pele de maneira mais rápida e eficiente. Estudos prévios avaliaram diferentes formas de administração do gel de *A. vera* durante vários dias no processo de cicatrização de lesões e atribuíram a redução da área lesionada ao aumento da taxa de colágeno produzida, em virtude da estimulação metabólica e proliferativa dos fibroblastos pelos compostos presentes na *A. vera* (CHITHRA; SAJITHLAL CHANDRAKASAN, 1998a, b; TAKZARE et al., 2009). Materiais compósitos de CB com *A. vera*, utilizando somente o gel de *A. vera* na suplementação do meio de cultura da bactéria, já foram previamente produzidos e caracterizados, e relatados na literatura (SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010). Entretanto, a suplementação com porções de *A. vera* no meio de cultura não foi elucidada, tão pouco o comportamento celular de fibroblastos sobre esses materiais. Neste capítulo serão apresentadas as condições de síntese utilizadas para produzir compósitos de CB-Aloe, em três concentrações distintas para cada uma das frações separadas, conforme discutido no Capítulo 3. As técnicas utilizadas na caracterização dos biomateriais serão apresentadas assim como os resultados obtidos quanto à morfologia, propriedades químicas e propriedades mecânicas. A citotoxicidade de cada biomaterial com suas características distintas foi avaliada quanto à adesão, viabilidade, morfologia e proliferação celular de fibroblastos L929 cultivados sobre a superfície dos materiais produzidos.

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1 Produção dos hidrogéis de CB com *A. vera*

#### 4.2.1.1 Preparação do meio de cultura

Para a produção dos hidrogéis de CB puros (sem *A. vera*) foi utilizado o meio de cultura contendo  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de manitol,  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de extrato de levedura e  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de peptona. Todos os componentes foram diluídos em 1 L de água destilada, o pH da solução foi ajustado para 6,5 e em seguida esta foi autoclavada durante 20 minutos a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  (BERTI, 2012; RECOUVREUX, 2008). Hidrogéis puros de CB foram utilizados como controle.

#### 4.2.1.2 Produção dos hidrogéis incorporados com frações de *A. vera*

Para incorporação da *A. vera* na síntese *in situ* da CB, foi preparada uma solução de  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de fração F que posteriormente seguiu para autoclavagem, juntamente com as frações T e G. Essas frações foram adicionadas em cinco diferentes concentrações no meio de cultura utilizado na produção dos hidrogéis puros de CB. O Quadro 2 apresenta os volumes das frações T, G e F utilizados como fonte de carbono secundária, juntamente com manitol (fonte de carbono principal) para crescimento da bactéria *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769.

Os hidrogéis de CB foram preparados com a adição de 90% (v/v) do meio de cultura (manitol) e 10% (v/v) de uma solução estoque de inóculo contendo a bactéria *G. hansenii*. Os demais meios de cultura contendo *A. vera* foram preparados e cada formulação do meio de cultura manitol/*A. vera* foi homogeneizada e logo após foi adicionado 10% (v/v) de inóculo da bactéria *G. hansenii*.

Para síntese dos hidrogéis, as culturas foram mantidas em placas de cultura de 24 poços (TPP, Switzerland), devidamente identificadas. Em cada poço, foi adicionado o volume de 1 mL de cada formulação. A formação das membranas ocorreu na interface ar/líquido durante 10 dias de cultura mantida à temperatura ambiente e sob condições estáticas de cultivo. Após 10 dias, os hidrogéis foram retirados das placas de 24 poços e foram sucessivamente purificados e esterilizados. Toda a manipulação do experimento foi realizada em câmara de fluxo laminar para assegurar a esterilidade do processo. Após 10 dias de cultivo bacteriano os hidrogéis de CB, CB-F, CB-G e CB-T foram sintetizados nas suas distintas formulações e seguiram para etapa de purificação.

Quadro 2 – Formulações dos hidrogéis de celulose bacteriana (% v/v).

Formulação	Hidrogéis de Celulose Bacteriana (CB)		
	CB-F	CB-G	CB-T
0%	10% SEI <sup>a</sup> + 90% MCM <sup>b</sup>		
20%	10% SEI <sup>a</sup> + 70% MCM <sup>b</sup> + 20% F	10% SEI <sup>a</sup> + 70% MCM <sup>b</sup> + 20% G	10% SEI <sup>a</sup> + 70% MCM <sup>b</sup> + 20% T
40%	10% SEI <sup>a</sup> + 50% MCM <sup>b</sup> + 40% F	10% SEI <sup>a</sup> + 50% MCM <sup>b</sup> + 40% G	10% SEI <sup>a</sup> + 50% MCM <sup>b</sup> + 40% T
60%	10% SEI <sup>a</sup> + 30% MCM <sup>b</sup> + 60% F	10% SEI <sup>a</sup> + 30% MCM <sup>b</sup> + 60% G	10% SEI <sup>a</sup> + 30% MCM <sup>b</sup> + 60% T
80%	10% SEI <sup>a</sup> + 10% MCM <sup>b</sup> + 80% F	10% SEI <sup>a</sup> + 10% MCM <sup>b</sup> + 80% G	10% SEI <sup>a</sup> + 10% MCM <sup>b</sup> + 80% T
100%	10% SEI <sup>a</sup> + 90% F	10% SEI <sup>a</sup> + 90% G	10% SEI <sup>a</sup> + 90% T

<sup>a</sup>SEI = solução estoque de inóculo, <sup>b</sup>MCM = meio de cultura à base de manitol.

#### 4.2.1.3 Purificação dos hidrogéis produzidos

A etapa de limpeza, ou purificação, consiste na remoção do meio de cultura intumescido nos hidrogéis e das bactérias neles presentes. Dessa forma, os hidrogéis foram colocados em frascos, previamente identificados, contendo NaOH 0,1 M, durante 24 horas a 50 °C. Após este período, os hidrogéis foram retirados dessa solução alcalina e lavados três vezes com água destilada. Ao final, o pH da água contendo os hidrogéis foi ajustado para uma faixa neutra (pH 7,4), seguindo então para a esterilização através de autoclavagem.

Os hidrogéis estéreis foram estocados à temperatura ambiente até sua utilização.

### 4.2.2 Caracterização dos hidrogéis de CB

#### 4.2.2.1 Capacidade de absorção de água

Para avaliar a capacidade de absorção de água todas as amostras foram previamente liofilizadas (24 h) e suas respectivas massas foram determinadas ( $m_{seca}$ ). Em seguida, as membranas secas foram imersas em água destilada por 24 horas até atingir o equilíbrio. Após este período, os hidrogéis foram retirados da água, depositados em um recipiente adequado, retirado o excesso superficial de água com papel

absorvente e determinada as suas respectivas massas ( $m_{úmida}$ ). Os dados de capacidade de absorção de água foram obtidos através da relação (4) (SHEZAD et al., 2010; UL-ISLAM, MAZHAR; KHAN, TAOUS PARK, JOONG KON, 2012):

$$\text{Capacidade de absorção de água} = \frac{m_{úmida} - m_{seca}}{m_{seca}} \quad (4)$$

Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente e em triplicata, com corpos de prova de diâmetro igual a 15,4 mm.

#### 4.2.2.2 Espectroscopia de infravermelho por refletância total atenuada (FTIR-ATR)

As amostras liofilizadas foram analisadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, realizada em aparato equipado com refletância total atenuada (ATR), modelo TENSOR 27 (Bruker, Alemanha) e cristal de ZnSe. Os espectros das amostras foram registrados para a faixa de 4000–600  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e acumulação de 16 varreduras.

#### 4.2.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os hidrogéis foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a fim de avaliar sua microestrutura. Previamente a esta análise as amostras foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , por aproximadamente 24 horas, e liofilizadas (24 h). As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ<sup>®</sup>, para estimar o diâmetro médio das fibras das amostras.

A preparação dos hidrogéis cultivados com fibroblastos para análise de citotoxicidade foram primeiramente lavados ( $2\times$ ) com solução tampão fosfato-salino (PBS). Logo após, as amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (1 h). Após fixação, as amostras foram desidratadas com séries de solução etanólica (30%, 40%, 50%, 70%, 90% e duas vezes com 100%), substituídas a cada 15 minutos e, finalmente, foram secas. A secagem foi realizada por ponto crítico de  $\text{CO}_2$  (Leica, EM CPD 030, Alemanha).

Todas as amostras foram metalizadas com ouro para posterior realização da análise no MEV Jeol 6390 LV (JEOL Ltd., Tokio, Japão) a uma tensão de 10 kV nas instalações do LCME/UFSC.

#### 4.2.2.4 Propriedades mecânicas dos hidrogéis de celulose bacteriana

As propriedades mecânicas dos hidrogéis de CB foram determinadas em um texturomêtro *Stable Micro Systems* (TA.XT Plus, Inglaterra), utilizando o software *Exponent Stable Micro Systems v. 5.1.1.0* com uma célula de carga de 500 N, no Laboratório de Materiais Elétricos – LaMatE/UFSC. Os módulos de tensão de ruptura, alongamento à ruptura e módulo de elasticidade foram determinados através das curvas de tensão-deformação.

Foram utilizadas três unidades de cada amostra, de dimensões 90 mm de comprimento por 15 mm de largura. A espessura de cada hidrogel foi determinada utilizando um paquímetro, após o cálculo da média de três medidas repetidas aleatoriamente. A separação inicial entre as garras e a velocidade do teste foram de 50 mm e  $0,05 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ , respectivamente.

#### 4.2.2.5 Difração de raios X

Para aquisição do padrão de difração de raios X das amostras foi utilizado um difratômetro de raios X, modelo Philips X'Pert, com radiação  $\text{CuK}\alpha$ , de 30 mA e potência de 40 kV. As condições de ensaio foram passo de  $1,00^\circ$ , tempo de passo de 1s e intervalo de medida em  $2\theta$ , de  $5$  a  $40^\circ$ . O grau de cristalinidade ( $\chi_c$ ) das membranas foi estimado a partir da razão entre o somatório das áreas sob os picos cristalinos – (110), (110) e (200) – e a área total do difratograma, de acordo com o método descrito por Watanabe e colaboradores (WATANABE *et al.*, 1998). O tamanho do cristalito foi estimado pelo pico de maior intensidade (2 0 0), através da equação de Scherrer como descrita por Nieduszynski e Preston (NIEDUSZY.I; PRESTON, 1970; TOKOH *et al.*, 1998).

### 4.2.3 Ensaios *in vitro*

#### 4.2.3.1 Preparo dos hidrogéis para cultura de células

Os hidrogéis de CB e CB-Aloe foram previamente preparados para os testes de citotoxicidade com as células L929. Todas as amostras foram dispostas em placas de 24 poços com a face mais densa (menos porosa) voltadas para cima. Em seguida, os hidrogéis foram mantidos no fundo do poço com corpos estéreis feitos de vidro, de forma cilíndrica vazada, ajustados com seu diâmetro externo ao diâmetro interno da

placa de 24 poços. Após, foram adicionados em cada poço 500  $\mu\text{L}$  de meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* – DMEM – (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen) sem suplementação de soro (incompleto). Esses hidrogéis foram incubados por 24 horas, em uma estufa com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e à temperatura de 37 °C para favorecer a troca da água pelo meio de cultura.

#### 4.2.3.2 Semeadura das células

Fibroblastos, da linhagem L929 foram cultivados em meio DMEM (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino – SBF – (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen), 0,5% de glicose (Sigma-Aldrich) e mantidos em atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$  e à temperatura de 37 °C. Após confluência celular de 80 a 90 % as células foram tripsinizadas e contadas utilizando-se exclusão por azul de tripan em uma câmara de Neubauer (SP LABOR, Brasil). Após a contagem das células, os hidrogéis, previamente preparados, conforme descrito na seção anterior, foram retirados da estufa de  $\text{CO}_2$  e o meio de cultura incompleto foi removido. As células foram semeadas sobre a superfície densa das membranas CB e CB-Aloe na concentração de  $10^5$  células/amostra (500  $\mu\text{L}$ ).

#### 4.2.3.3 Avaliação da adesão, citotoxicidade e morfologia celular

A citotoxicidade celular foi avaliada pelo teste colorimétrico com MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio], realizado em triplicata, em função do tempo de cultura de 24 e 48 horas.

Para realização do ensaio, o meio de cultura foi removido dos poços e os hidrogéis foram lavados duas vezes com solução fosfato salina – PBS – (Sigma-Aldrich). Após a lavagem, foram retirados os vidros cilíndricos e os hidrogéis foram transferidos para uma nova placa de 24 poços. Sobre cada hidrogel foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de meio DMEM e 60  $\mu\text{L}$  do reagente MTS. As amostras foram incubadas por 1 hora em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  à temperatura de 37 °C, em triplicata. Após a incubação cada amostra foi homogeneizada e 100  $\mu\text{L}$  de solução foram transferidos para uma nova placa de 96 poços. A absorbância foi determinada a 490 nm em um leitor de microplacas (Thermo Placa TP Leitor NM, China). Os fibroblastos cultivados diretamente no hidrogel puro de CB foram utilizados como grupo controle.

A viabilidade celular foi avaliada qualitativamente utilizando o kit Live/Dead<sup>®</sup>-Viability/Citotoxicity (Invitrogen). Inicialmente foi preparada uma solução (4:1) de calceína:homodímero de etídio em PBS. Uma alíquota de 100 µL da solução preparada foi adicionada sobre cada hidrogel, seguindo para incubação por 45 minutos em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 °C. Ao final do período de incubação os hidrogéis foram montados em lâminas para visualização no microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ci-L, Tóquio, Japão).

A morfologia celular dos fibroblastos cultivados na face superior do hidrogel de celulose foi avaliada por microscopia de fluorescência. Após o período de cultura (24 e 48 horas) as células foram lavadas com PBS (três vezes), fixadas com formaldeído 3,7% em PBS e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 em PBS. Para visualização dos filamentos de F-actina, as células foram coradas com o corante Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). O núcleo das células foi corado com DAPI (sal dihidroclorídrico, 4',6-diamino-2-fenilindol), (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) e Prolong Gold<sup>®</sup> foi adicionado para garantir a manutenção da fluorescência das amostras. Os hidrogéis foram montados em lâminas e visualizados no microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ci-L, Tóquio, Japão).

#### **4.2.4 Análise estatística**

Os dados foram avaliados estatisticamente utilizando-se o software Statistica 7.0 (StatSoft Software, Tulsa, OK, USA). Os resultados experimentais foram expressos como a média ± erro padrão da média (EPM) e comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste Tukey considerando-se estatisticamente diferentes para  $p < 0,05$ .

### **4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

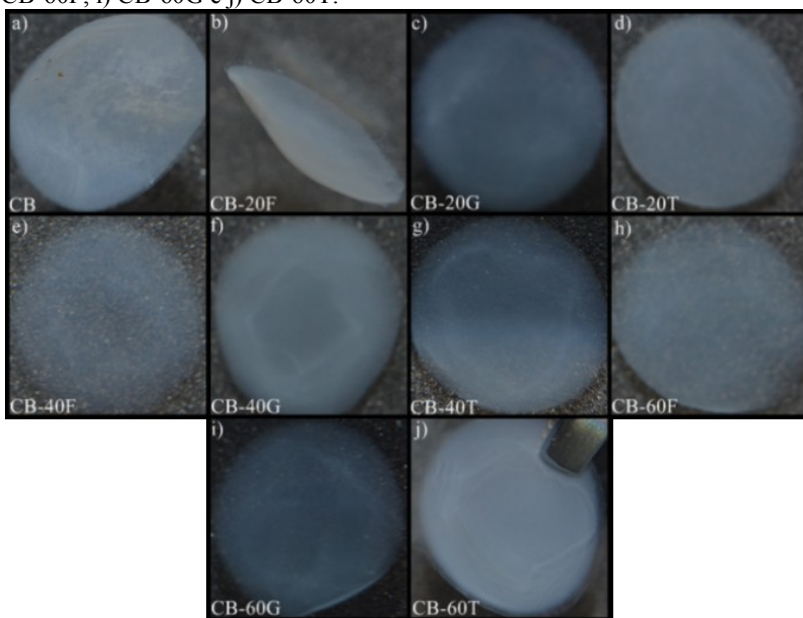
#### **4.3.1 Produção e caracterização dos hidrogéis de celulose bacteriana**

Os hidrogéis de CB-F, CB-G e CB-T foram obtidos com sucesso quando 20, 40 e 60% das diferentes porções de *A. vera* foram adicionadas as formulações com meio manitol. Quando 80% das porções F, G e T foram adicionadas ao meio manitol e/ou 100% destas porções foram utilizados no cultivo da bactéria *G. hansenii* não houve formação de hidrogéis estáveis pela referida bactéria.



As dificuldades de preparação de hidrogéis de CB quando a composição química do meio é superior a 60% de frações F, G e T de *A. vera* sugere que a fonte de carbono principal da bactéria continua sendo o manitol. Os hidrogéis produzidos (20-60%) com as porções T, G e F quando hidratados são de aspecto muito semelhante a olho nu, como mostrado na Figura 10. No entanto, as micrografias de MEV revelam uma diferença expressiva na topografia de cada um destes biomateriais sintetizados, principalmente no que se refere à superfície superior e inferior da membrana. As fraturas transversais dos hidrogéis de CB, CB-F, CB-G e CB-T mostram que a organização estrutural de cada hidrogel é modificada em função da composição do meio de cultura (Figuras 11, 12 e 13).

Figura 10 – Semelhança dos hidrogéis de celulose bacteriana e CB-Aloe: a) CB, b) CB-20F, c) CB-20G, d) CB-20T, e) CB-40F, f) CB-40G, g) CB-40T, h) CB-60F, i) CB-60G e j) CB-60T.



#### 4.3.1.1 Morfologia e microestrutura

A Figura 11 mostra a morfologia típica do hidrogel de CB, onde (a) representa a fratura transversal da membrana, (b) a superfície superior e (c) a superfície inferior. A superfície que se forma na

interface com o ar no cultivo (b) apresenta uma rede com alta densidade de fibras, seguida por uma rede porosa, com poros de tamanhos variados, que se estende até a face em contato com o líquido (c), com fibras livremente orientadas conforme relatada por outros autores (BACKDAHL et al., 2006; BERTI, 2012; TANG et al., 2010; UL-ISLAM, M.; KHAN, T. PARK, J. K., 2012). A Figura 11 (d–m) mostra a microestrutura dos hidrogéis de CB-F obtida após 10 dias de cultivo bacteriano (CB-20F, CB-40F e CB-60F). A membrana suplementada com 20% de F (CB-20F d–f) possui a microestrutura da superfície superior (e) e interna (d) bastante similar à da CB pura; entretanto, sua superfície inferior possui menor densidade de fibras (f). CB-40F e CB-60F possuem densidade de fibras similar à CB pura na superfície inferior (i e h). No entanto, a seção transversal revela que existe uma tendência à organização de uma microestrutura interna específica (g e j), com poros mais definidos, sendo que a superfície superior possui maior heterogeneidade, com alta densidade de fibras, e espaçamento maior entre elas (h e l).

A Figura 12 mostra a microestrutura dos hidrogéis produzidos com formulações à base da fração G, ou seja, os hidrogéis CB-G. A superfície superior das três formulações utilizadas, 20, 40 e 60% (b, e, h) exibe uma estrutura homogênea sem grandes poros. O corte sagital (a, d, g) das membranas apresenta uma rede porosa interconectada por uma formação lamelar fina específica (malha) que se estende até a face inferior (c, f, i). Na face inferior os poros são preenchidos com uma malha de microfibrilas o que parece corresponder à porção G da *A. vera*.

Os hidrogéis produzidos na formulação do meio de cultura com diferentes concentrações da porção T foram caracterizados quanto à microestrutura, conforme mostrados na Figura 13. A superfície superior do hidrogel CB-20T (b) apresenta uma estrutura semelhante à mesma superfície da CB pura (Fig. 11 b). O corte transversal (a) e a superfície inferior (c) também foram analisados. A superfície inferior também possui microfibrilas que preenchem os poros e recobrem as fibras mais espessas. A superfície superior de CB-40T (e) e CB-60T (h) se assemelha à superfície das amostras sintetizadas com diferentes formulações da porção G. O corte sagital do hidrogel CB-40T (d) revelou uma microestrutura interessante por apresentar uma distribuição vertical contínua da porosidade. As fibras estão distribuídas e interconectadas em três camadas distintas, onde a primeira camada é constituída por uma superfície com alta densidade de fibras, seguida por uma camada que apresenta porosidade intermediária quando comparada ao tamanho de poros da última camada. A presença de lamelas ou

compartimentos maiores é observada na última camada que possui uma rede de microfibrilas interconectadas até a face inferior (i). A microestrutura da amostra CB-40T apresenta um aspecto que lembra a pele em toda a sua constituição física. Nesta comparação, a primeira camada representaria a epiderme, a segunda camada a derme e a última camada a hipoderme (CLARK, 2014). Esta característica sugere que a co-cultura ou cultura mista envolvendo as linhagens celulares que constituem a pele poderiam resultar em uma plataforma de cultura 3D adequada para ensaios de mimetização de pele ou mesmo de possíveis substitutos de pele.

Figura 11 – Micrografias dos hidrogéis liofilizados de CB (a–c), CB-20F (d–f), CB-40F (g–i) e CB-60F (j–m) evidenciando: faces superior, inferior e fratura. Magnitudes de ampliação a) 430×, b) 5.000×, c) 5.000×, d) 700×, e) 5.000×, f) 5.000×, g) 900×, h) 5.000×, i) 5.000×, j) 3.000×, l) 5.000× e m) 5.000×.

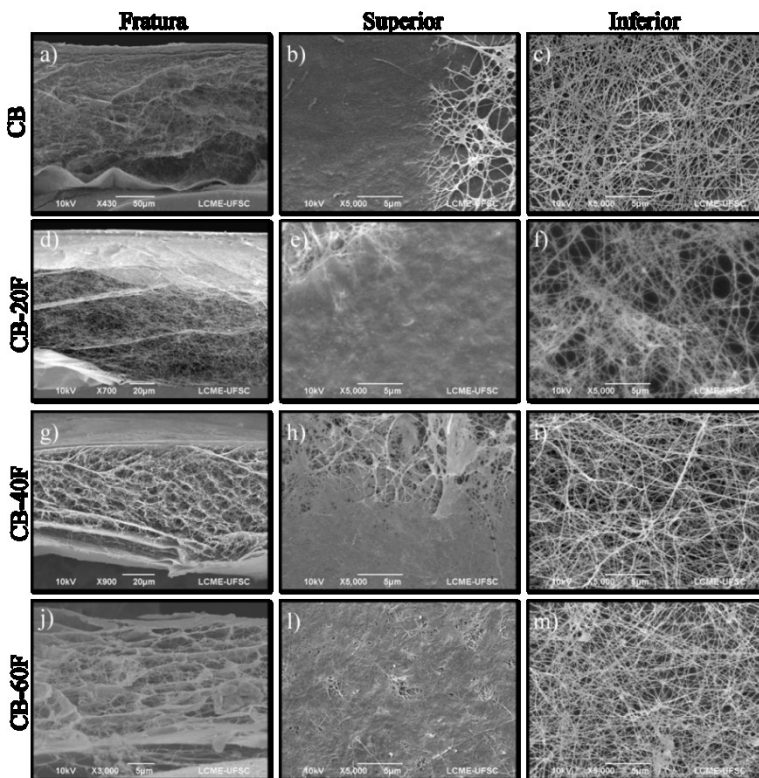
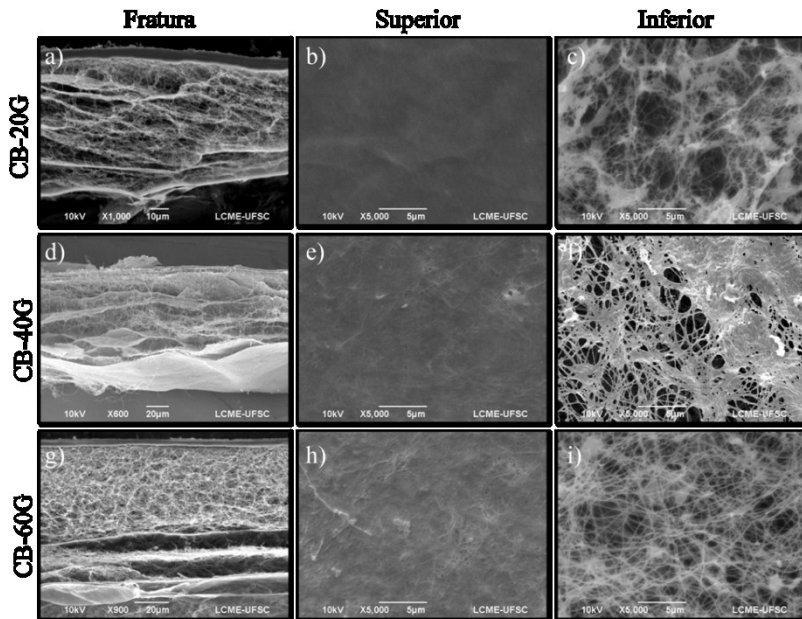


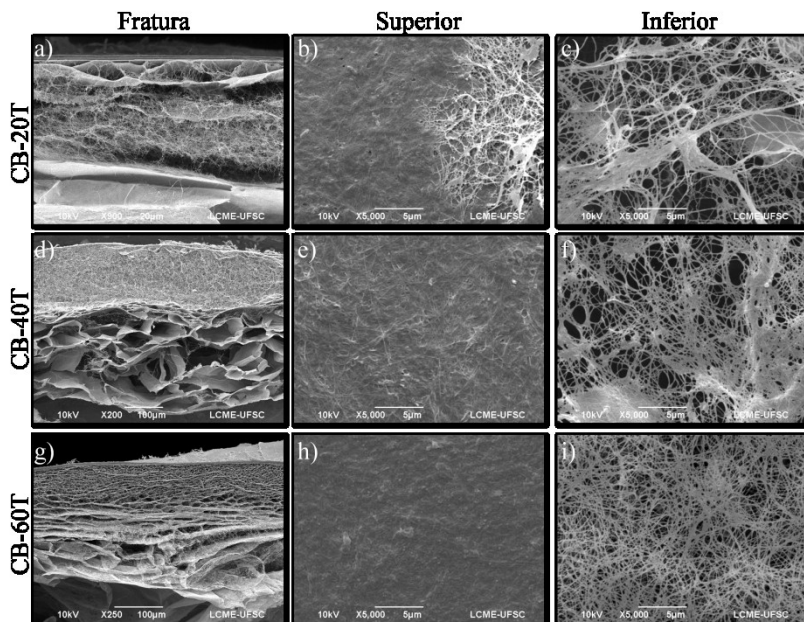
Figura 12 – Micrografias dos hidrogéis liofilizados de CB-20G (a–c), CB-40G (d–f) e CB-60G (g–i) evidenciando: fratura, face inferior e face superior. Magnitudes de ampliação a) 1.000×, b) 5.000×, c) 5.000×, d) 600×, e) 5.000×, f) 5.000×, g) 900×, h) 5.000× e i) 5.000×.



A Figura 14 (a–c) destaca os detalhes observados do corte sagital da membrana CB-40T e também detalhes da superfície inferior do mesmo hidrogel (d). A superfície inferior deste hidrogel possui uma microestrutura compacta de fibras com ausência de porosidade e algumas nervuras o que é muito similar ao gel de *A. vera* mostrado na Figura 9 (i).

Na Figura 13, o corte sagital de CB-60T (g) mostra que a microestrutura é ordenada em pequenos poros no topo, interconectados por finas lamelas, que gradativamente aumentam de tamanho até a face inferior. A superfície inferior é constituída por uma rede fibrosa, mas não possui microfibrilas interligando as fibras maiores. Os detalhes da superfície inferior e do corte transversal do hidrogel CB-60T estão apresentados na Figura 15.

Figura 13 – Micrografias dos hidrogéis liofilizados de CB-20T (a–c), CB-40T (d–f) e CB-60T (g–i) evidenciando: fratura, face inferior e face superior. Magnitudes de ampliação a) 900 $\times$ , b) 5.000 $\times$ , c) 5.000 $\times$ , d) 200 $\times$ , e) 5.000 $\times$ , f) 5.000 $\times$ , g) 250 $\times$ , h) 5.000 $\times$  e i) 5.000 $\times$ .



De acordo com as micrografias, a membrana de CB-40T se destaca devido à integridade de sua morfologia em relação às demais amostras. A perda de alguns detalhes microestruturais se deve à imprecisão do método de corte das membranas que facilmente podem ser esmagadas e colapsar mesmo quando sujeitas à mínima força exercida sobre elas para realização da fratura.

Figura 14 – Detalhes da microestrutura interna da membrana CB-40T: Conexão das lamelas por microfibrilas (1-b), lamelas na parte superior da membrana (2-c) e a superfície superior de uma lamela na região inferior (3-d). Magnitudes de ampliação a) 200×, b) 1.500×, c) 1.500× e d) 5.000×.

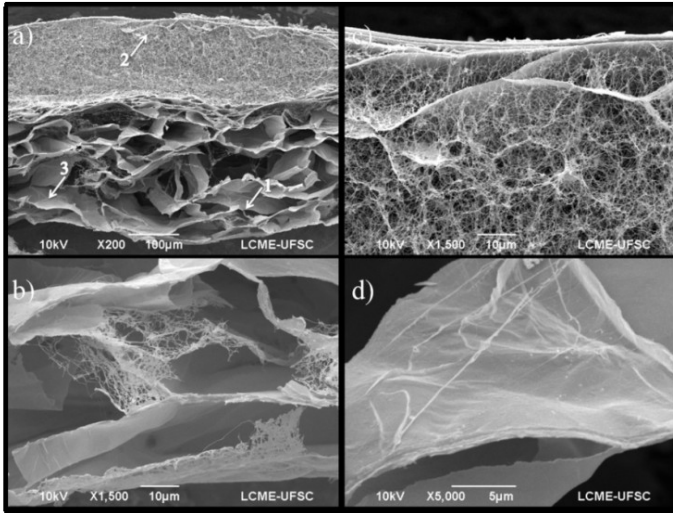
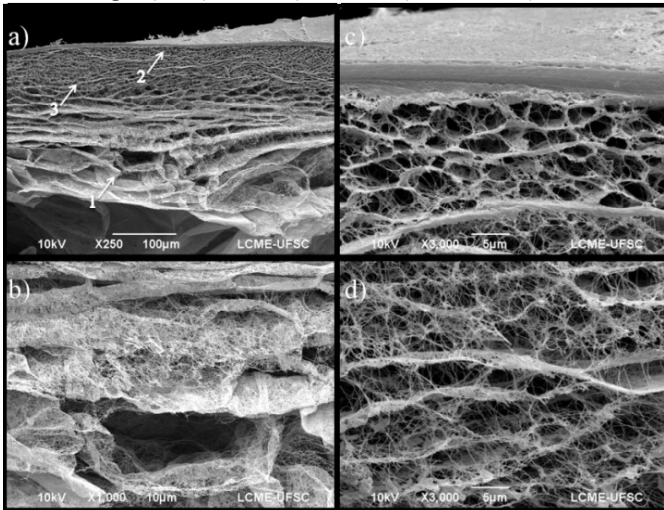


Figura 15 - Detalhes da microestrutura interna da membrana CB-60T: Poro na região inferior (1-b), poros e lamelas superiores (2-c) e poros internos (3-d). Magnitudes de ampliação a) 250×, b) 1.000×, c) 3.000× e d) 3.000×.



### 4.3.1.2 Diâmetro de fibras

A influência das frações T, G e F sobre as fibras de CB foi avaliada através do diâmetro médio das fibras que constituem os hidrogéis produzidos. Desta forma pode-se observar que existem diferenças no diâmetro médio das fibras dos hidrogéis sintetizados Tabela 3.

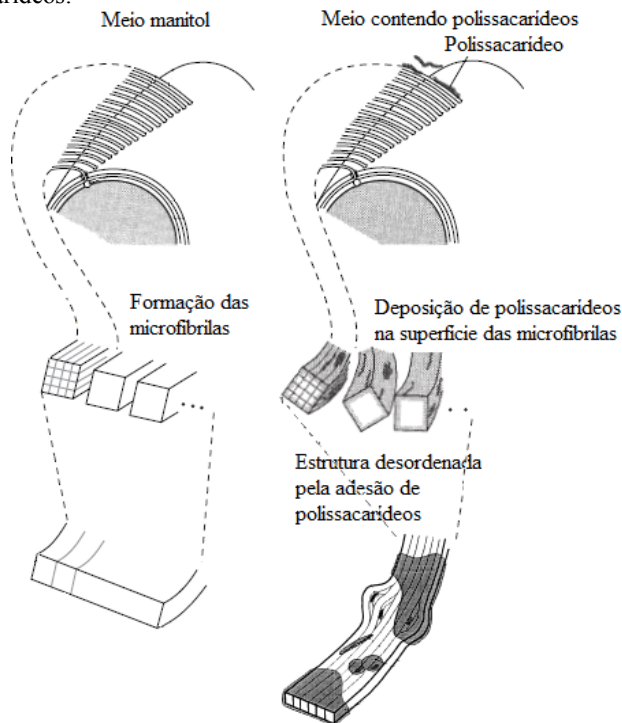
Tabela 3 – Variação do diâmetro das fibras conforme a formulação do hidrogel. Diâmetro representado com a média  $\pm$  EPM.

Grupo	Amostra	Diâmetro médio das fibras (nm)
F	CB	87,45 $\pm$ 1,91
	CB-20F	81,57 $\pm$ 1,72
	CB-40F	88,58 $\pm$ 2,48
	CB-60F	90,64 $\pm$ 2,12
G	CB-20G	79,97 $\pm$ 1,51
	CB-40G	100,64 $\pm$ 3,21
	CB-60G	122,35 $\pm$ 3,38
T	CB-20T	98,20 $\pm$ 2,92
	CB-40T	102,65 $\pm$ 3,11
	CB-60T	128,90 $\pm$ 3,79

As amostras evidenciam um aumento gradativo do diâmetro médio das fibras com o incremento da concentração de F, G ou T. Outros materiais compósitos de CB-acemanana e CB-quitosana mostraram lamelas e regiões reticuladas similares às destacadas (KIM et al., 2011; RECOUVREUX, 2008). Em condições hidratadas, hidrogéis de CB-Aloe vera apresentaram a presença de gel em toda a superfície da membrana reduzindo a densidade de fibras nesta região (SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010). Por outro lado, nas condições analisadas não se observa essa redução. Estudos destacam que a adição de polissacarídeos à base de glicomananas e/ou galatomananas no meio de cultura da CB afeta o processo de formação da fibra de celulose. Esses polissacarídeos aderem sobre a superfície das microfibrilas e se depositam sobre as fibras favorecendo a reticulação, o colapso e o aumento do diâmetro das fibras de celulose (TOKOH et al., 1998; TOKOH et al., 2002a, b; WHITNEY et al., 1998). A Figura 16 ilustra o processo de formação da fibra de celulose em meio de cultura à

base de manitol, como fonte de carbono, suplementado com polissacarídeos, conforme sugerido na literatura.

Figura 16 – Ilustração da formação da fibra de celulose em meio manitol e a desorganização da formação das fibras em meio suplementado com polissacarídeos.



Fonte: Adaptado de Tokoh e colaboradores (TOKOH et al., 1998; TOKOH et al., 2002a)

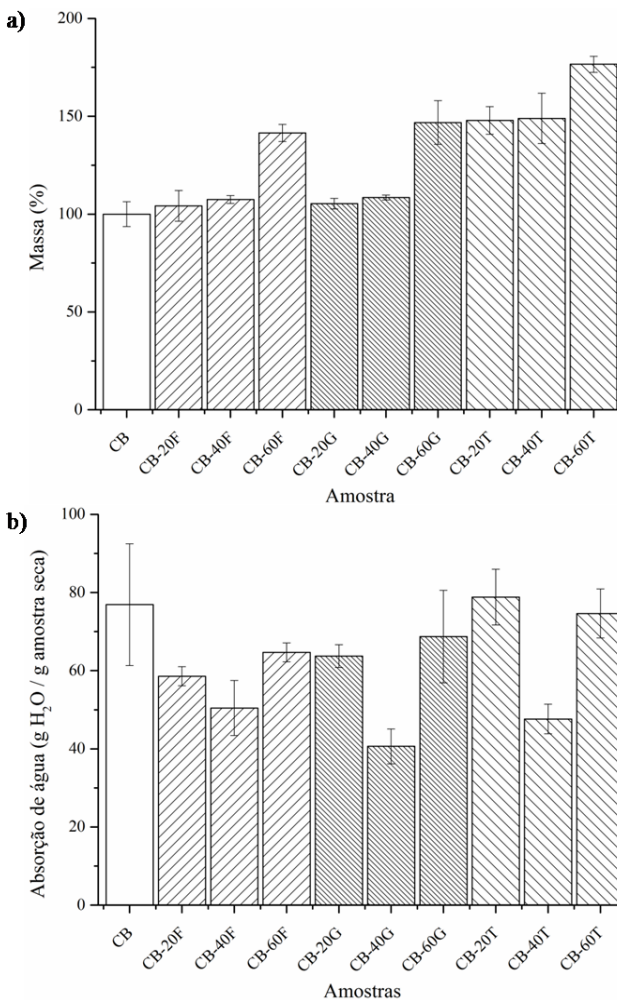
A adesão e a deposição dos polissacarídeos sobre as fibras de celulose alteram as características físico-químicas dos hidrogéis. Isto se reflete diretamente na cristalinidade, nas propriedades mecânicas, no diâmetro das fibras e na capacidade de absorção de água do material.

#### 4.3.1.3 Variação da massa e capacidade de absorção de água

Figura 17 mostra a alteração das massas das membranas CB, CB-T, CB-G e CB-F após serem liofilizadas (a) e a capacidade de absorção de água dos respectivos hidrogéis de CB (b).



Figura 17 – Massa percentual dos hidrogéis de CB, CB-T, CB-G e CB-F nas suas diferentes composições após serem liofilizadas (a) e a capacidade de absorção de água dos hidrogéis de CB. Os dados das massas foram normalizados com a massa da membrana CB e representados com a média  $\pm$  EPM.



Após a suplementação do meio com F, G ou T os hidrogéis sintetizados com frações a 60% resultam em maior massa do que os mesmos hidrogéis sintetizados com 20 e 40%. Os hidrogéis obtidos com

20 e 40% da porção T possuem a mesma massa que os hidrogéis sintetizados com 60% das porções F e G. A maior massa é atribuída ao hidrogel sintetizado com 60% da porção T o que pode estar relacionado com a presença de maior quantidade de polissacarídeos já que esta porção é considerada a porção primária de extração do gel de *Aloe*.

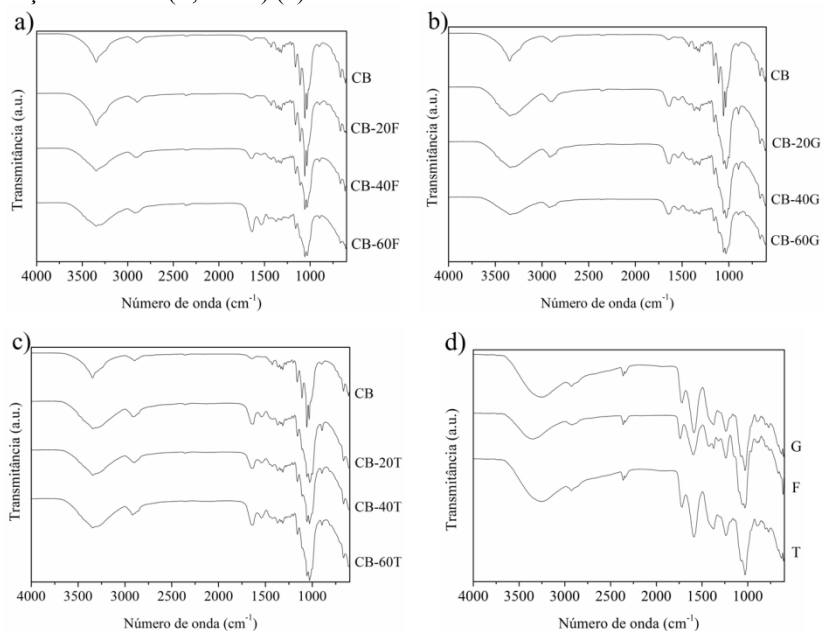
A CB pura apresentou capacidade de absorver aproximadamente 77 g de água/g de CB seca (Figura 17b). As demais membranas apresentaram uma redução na capacidade de absorção de água, em relação à CB pura. Apenas o hidrogel CB-20T absorveu aproximadamente a mesma quantidade de água que o hidrogel de CB (79 g H<sub>2</sub>O/g amostra). As amostras sintetizadas com 40% de F, G ou T no meio de cultura absorveram uma massa menor de água do que as membranas sintetizadas com as mesmas porções a 20 e 60%. Estes resultados corroboram os resultados prévios da literatura onde os hidrogéis de CB produzidos com 30 a 50% (v/v) de gel de *A. vera* tiveram uma capacidade de absorção de água reduzida quando comparados com a CB pura (SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010). Essas observações sugerem a existência de uma fase de transição no processo de formação das fibras de celulose quando o meio de cultura bacteriano é suplementado com 30% a 50% de gel de *A. vera*.

Diversos fatores podem alterar a absorção de água da membrana de CB como, por exemplo, variações na composição do meio de cultura envolvendo a fonte de carbono, o tempo de fermentação, os pós-tratamentos e os processos de secagem (GUO; CATCHMARK, 2012; SHEZAD et al., 2010; STUMPF et al., 2013; TANG et al., 2010; UL-ISLAM, M.; KHAN, T. PARK, J. K., 2012). Essas modificações alteram a disponibilidade de grupos hidrofílicos e as características microestruturais dos hidrogéis sintetizados em forma de membranas. Neste caso, a adição das porções F, G ou T no meio de cultura da CB afetou a capacidade de absorção de água dos hidrogéis. Conforme relatos da literatura, a adição de gel de *A. vera* em proporções de até 30% (v/v) na produção de biomateriais com alginato, quitosana e CB aumentam a absorção de água dos novos biomateriais compósitos quando comparados ao biomaterial puro (JITHENDRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2011; SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010; SILVA; POPA; et al., 2013). A explicação para esta observação foi atribuída à adição e a disponibilidade de grupos hidrofílicos, provenientes da *A. vera*, incorporados nesses materiais. Em contrapartida, estudos demonstraram que a redução da capacidade de absorção de água pode ser influenciada pelo *crosslinking* entre a quitosana e a *A. vera*, que ocasiona a diminuição da quantidade dos

grupos  $-NH_2-$  disponíveis capazes de formar ligações de hidrogênio com a água (SILVA; CARIDADE; *et al.*, 2013).

A presença de grupos funcionais das amostras modificadas foi analisada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) combinado com refletância total atenuada (ATR). Este ensaio teve como intuito identificar diferentes grupos funcionais presentes nos hidrogéis sintetizados com *A. vera* (CB-T, CB-G e CB-F) em comparação aos tipicamente observados na CB. A Figura 18 mostra o perfil dos espectros de FTIR-ATR dos hidrogéis sintetizados com as distintas frações de *A. vera*, assim como o espectro da CB de referência.

Figura 18 – Espectros de FTIR-ATR das membranas formuladas com as distintas frações de *A. vera* CB-F (a), CB-G (b) e CB-T (c), da CB pura (a -c) e das frações isoladas (T, G e F) (d).

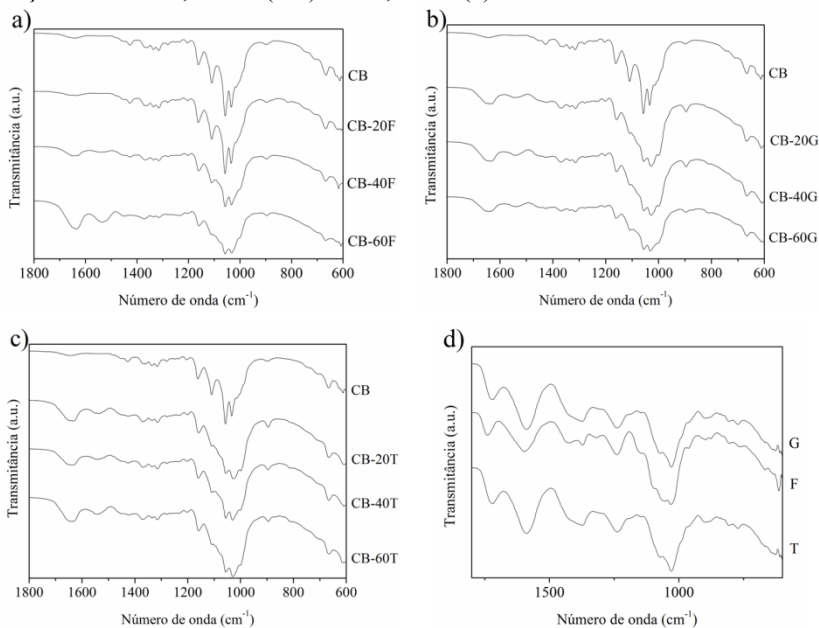


No espectro da CB são encontradas as bandas típicas em 3346 cm<sup>-1</sup> de estiramento da ligação OH, 2897 cm<sup>-1</sup> estiramento assimétrico de CH<sub>2</sub>; 1645 cm<sup>-1</sup> refere-se à água adsorvida, 1427 cm<sup>-1</sup> a vibrações da ligação HCH e OCH, 1370 cm<sup>-1</sup> deformação CH e estiramento CO, 1315cm<sup>-1</sup> deformação angular simétrica fora do plano CH<sub>2</sub>, 1161 cm<sup>-1</sup> estiramento assimétrico COC, 1109–1057 cm<sup>-1</sup> estiramento CO e CC,

897  $\text{cm}^{-1}$  e 667  $\text{cm}^{-1}$ , vibração CH e COH fora do plano, respectivamente (KACURAKOVA et al., 2002; MOVASAGHI; REHMAN UR REHMAN, 2008; MULLER et al., 2011; OH et al., 2005; STUMPF et al., 2013).

Todas as amostras modificadas apresentam bandas similares com o espectro da CB pura na faixa de 4000–1800  $\text{cm}^{-1}$ , com alargamento na região de 3340  $\text{cm}^{-1}$  que pode ser referente à presença de moléculas de água na estrutura. As variações das bandas são mais evidentes na região de 1800–600  $\text{cm}^{-1}$  e estão destacadas na Figura 19.

Figura 19 – Destaque das principais bandas das membranas formuladas com as frações de *A. vera*, da CB (a–c) e de F, G e T (d).



Os espectros das membranas formuladas com *A. vera* (a–c) exibem duas bandas proeminentes e distintas da CB pura, em 1641 e 1547  $\text{cm}^{-1}$ , com exceção da amostra CB-20F (Figura 19 a) que não apresenta a segunda banda. Nesta região, essas bandas são atribuídas a vibrações de grupos NH e CO, de amidas primárias e secundárias, provenientes de proteínas da *A. vera*. A presença dessas duas bandas nos espectros sugere a existência de interações intermoleculares (como interações de hidrogênio) entre a CB e a *A. vera* (JITHENDRA et al.,

2013; SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010; SANGEETHA; RAJESHWARI VENCKATESH, 2011; SILVA; POPA; et al., 2013). Além disso, as sobreposições das bandas na região de 1200–900  $\text{cm}^{-1}$  podem ser mais um indicativo de interações entre compostos de *A. vera* e a CB.

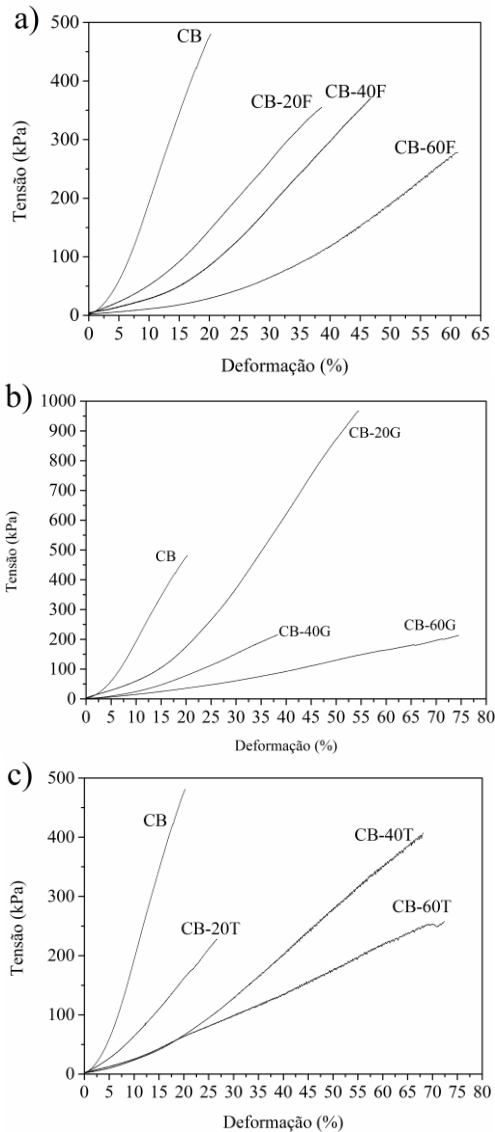
#### 4.3.1.4 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos hidrogéis sintetizados com e sem *A. vera* estão apresentadas nas curvas de tensão  $\times$  deformação da Figura 20. O hidrogel de CB evidenciou menor deformação e maior tensão de ruptura dentre todas as amostras (exceto CB-20G, b). Como as propriedades mecânicas estão intimamente ligadas à microestrutura e à cristalinidade do material, à medida que o meio de cultura bacteriano foi suplementado com as porções de *A. vera* os hidrogéis produzidos apresentaram variações significativas ( $p < 0,05$ ) na extensibilidade e elasticidade (b–d). Isto é evidenciado pelo aumento nos valores de alongamento dos hidrogéis (CB-T, CB-G e CB-F) antes da ruptura.

Essas alterações estão correlacionadas com o aumento de fase amorfa (*A. vera*) na CB, que se deposita sobre a superfície das microfibrilas, formando, em algumas regiões, pontos críticos suscetíveis à quebra. Consequentemente, a quantidade de interações intermoleculares (ligações de hidrogênio), que conferem rigidez à estrutura, é reduzida. Além disso, a fase amorfa presente entre microfibrilas de CB pode permitir o movimento dessas fibras durante a aplicação de uma força de tração, aumentando assim a extensibilidade do material. A redução no módulo de elasticidade e na tensão de ruptura das amostras também foi observada, como mostrado na Tabela 4.

O módulo de elasticidade das amostras modificadas se manteve menor que o módulo da CB nas membranas formuladas com F, G e T. A tensão de ruptura seguiu o mesmo padrão, com exceção da amostra CB-20G que apresentou um aumento. O alongamento de ruptura de F, G e T foi maior que o apresentado pela CB, e essas amostras apresentaram perfil semelhante de aumento crescente conforme a porcentagem de formulação.

Figura 20 – Curva de tensão × deformação dos hidrogéis de celulose bacteriana e CB-F (a), CB-G (b) e CB-T (c). Dados representativos de uma repetição desta análise.



Estudos anteriores evidenciaram alterações das propriedades mecânicas da CB com suplementação do meio com *A. vera* de até 30%

(v/v) (aumento dos valores), seguidas pela redução dos valores dessas propriedades com suplementação de até 50%(SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010). Blendas de quitosana e gel de *A. vera* também exibiram melhoria das propriedades mecânicas até 20%(KHOSHGOZARAN-ABRAS *et al.*, 2012). Entretanto, a faixa de valores apresentados na literatura para o módulo de elasticidade (0,1–16 GPa), tensão (3–85 MPa) e alongamento de ruptura (1 – 5%) refere-se a amostras secas de CB(MULLER *et al.*, 2013; SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010; YAMANAKA *et al.*, 1989). Amostras no estado hidratado exibem redução dos valores das propriedades mecânicas devido à redução da organização da estrutura e ao aumento das interações de hidrogênio entre a água e as fibras(GEORGE *et al.*, 2005).

Tabela 4 – Propriedades mecânicas dos hidrogéis de CB. Dados representados com a média  $\pm$  EPM.

<i>Amostras</i>	<i>Módulo de elasticidade (kPa)</i>	<i>Alongamento de ruptura (%)</i>	<i>Tensão de ruptura (kPa)</i>
CB	26,89 $\pm$ 2,17	21,11 $\pm$ 0,73	482,88 $\pm$ 35,41
CB-20F	11,41 $\pm$ 0,07*	39,49 $\pm$ 1,07	342,40 $\pm$ 14,10
CB-40F	13,37 $\pm$ 1,44*	58,74 $\pm$ 3,33*	406,15 $\pm$ 51,75
CB-60F	7,79 $\pm$ 0,32*	61,61 $\pm$ 3,92*	262,72 $\pm$ 12,15
CB-20G	20,71 $\pm$ 2,83	37,65 $\pm$ 8,63	609,72 $\pm$ 179,15
CB-40G	6,81 $\pm$ 0,76*	53,20 $\pm$ 3,51*	229,10 $\pm$ 31,86
CB-60G	3,70 $\pm$ 0,10*	70,36 $\pm$ 4,03*	232,00 $\pm$ 25,22
CB-20T	7,17 $\pm$ 0,33*	31,03 $\pm$ 1,19	211,41 $\pm$ 12,33
CB-40T	7,14 $\pm$ 0,36*	70,47 $\pm$ 4,16*	423,12 $\pm$ 9,07
CB-60T	4,85 $\pm$ 0,64*	72,89 $\pm$ 3,90*	238,38 $\pm$ 18,59

\*  $p < 0,05$

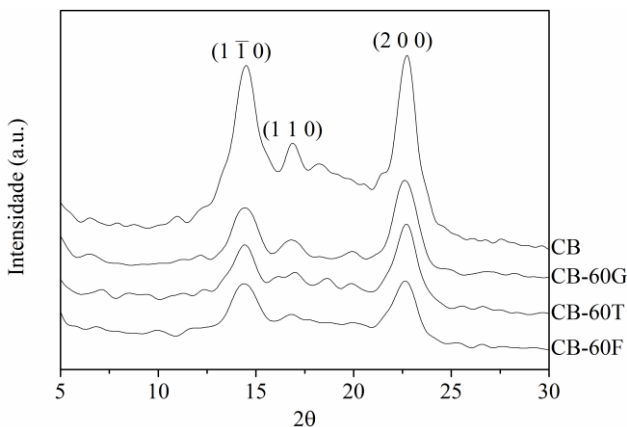
#### 4.3.1.5 Cristalinidade

A Figura 21 apresenta os difratogramas de raios X da CB, CB-60F, CB-60G e CB-60T. Três picos de difração principais, correspondentes aos planos (1 $\bar{1}$ 0), (110) e (200), característicos de celulose I podem ser identificados(MULLER *et al.*, 2011; RAMBO *et al.*, 2008; TOKOH *et al.*, 1998). Os picos das membranas modificadas de CB não apresentaram deslocamento significativo em  $2\theta$ . Entretanto, após a incorporação de porções amorfas nas membranas, uma

diminuição da intensidade dos picos, bem como uma redução da cristalinidade e do tamanho do cristalito foram observados. O menor tamanho de cristalito foi exibido pela CB-60F (3,9 nm), seguida pela CB-60T (4,4 nm), CB-60G (4,8 nm) e CB (5,3 nm). O grau de cristalinidade estimado das amostras segue a seguinte ordem decrescente: CB (51,3%) > CB-60G (44,8%) > CB-60F (43,5%) > CB-60T (35,8%). É importante observar que a adição das frações polissacarídicas não alterou parâmetros da célula unitária da celulose; apenas modificou o grau de cristalinidade das membranas.

A análise de difratometria raios X foi realizada apenas com as membranas modificadas com 60% e com a CB pura em razão dos resultados apresentados para avaliação de viabilidade celular (MTS) que serão mostrados na seção 4.3.2.

Figura 21 – Difractogramas de raios X das membranas de CB, CB-60F, CB-60G, CB-60T.



## 4.3.2 Avaliação da citotoxicidade, morfologia, viabilidade e adesão celular

### 4.3.2.1 Citotoxicidade e viabilidade celular

As Figuras 22, 23 e 24 mostram os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular, realizados através do método colorimétrico de MTS. Para esses ensaios, as células de fibroblastos da linhagem L929 foram cultivadas, em uma densidade celular de  $10^5$  células/amostra, sobre os hidrogéis de CB, CB-T, CB-G e CB-F por 24 e 48 horas de cultura. Como os hidrogéis possuem superfícies distintas, no



que se refere à densidade de fibras, é importante salientar que as células de fibroblastos foram cultivadas nas superfícies que apresentam maior densidade de fibras. Os dados obtidos foram normalizados com CB pura em 24 horas ( $Abs_{492\text{ nm}} = 0,658$ ) e as barras de erro estão representadas pelo EPM.

Figura 22 – Viabilidade celular dos fibroblastos cultivados na superfície lisa dos hidrogéis de CB e CB-F.

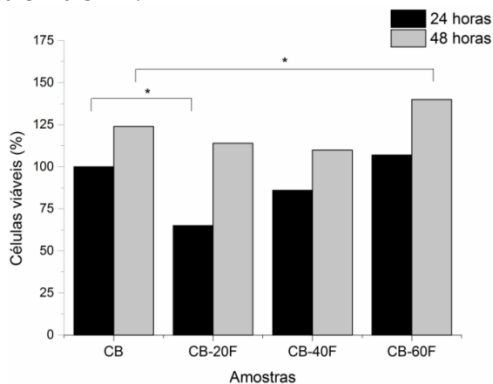
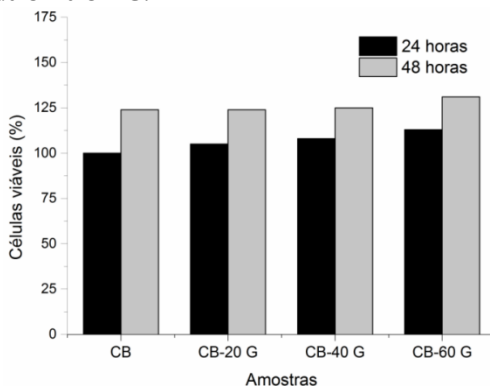


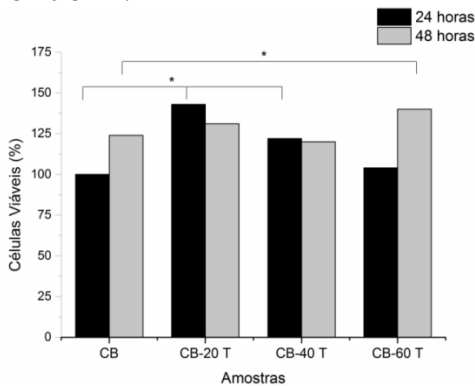
Figura 23 – Viabilidade celular dos fibroblastos cultivados na superfície lisa dos hidrogéis de CB e CB-G.



As Figuras 22, 23 e 24 mostram que após 24 e 48 horas de cultivo os hidrogéis de CB sintetizados com porções de *A. vera* não foram citotóxicos para as células de fibroblastos. Após 24 horas de cultivo as células de fibroblastos permaneceram viáveis quando cultivadas sobre os diferentes hidrogéis sintetizados. Considerando-se como grupo controle as amostras de CB pura, pode-se observar que após 24 h as

células cultivadas sobre o hidrogel CB-20T tiveram uma viabilidade celular 43% maior do que quando a mesma quantidade de células foi semeada na CB pura. As células cultivadas nos hidrogéis CB-20F e CB-40F apresentaram viabilidade inferior àquelas cultivadas nas amostras de CB e CB-60F. As amostras sintetizadas com 20, 40 e 60% da porção G de *A. vera* mantiveram praticamente a mesma quantidade de células viáveis do que quando cultivadas sobre o hidrogel de CB. É importante salientar que após 24 horas de cultura o número de células viáveis foi significativamente maior nos hidrogéis de CB-20T e CB-40T ( $p < 0,05$ ), o que não foi observado para o hidrogel CB-60T quando comparado ao grupo controle (CB).

Figura 24 – Viabilidade celular dos fibroblastos cultivados na superfície lisa dos hidrogéis de CB e CB-T.



Após 48 horas de cultivo as células se mantiveram viáveis em todos os hidrogéis e a maioria apresentou aumento da proliferação celular, em relação as primeiras 24 horas, exceto nos hidrogéis CB-20T e CB-40T. As células cultivadas sobre os hidrogéis CB-60F e CB-60T apresentaram viabilidade similar, com 16% acima da quantidade de células viáveis em relação à CB pura, e significativamente ( $p < 0,05$ ) maior que a viabilidade da CB pura. Os hidrogéis CB-20G, CB-40G e CB-60G mantiveram o mesmo padrão observado em 24 horas de cultura celular, com similaridade da viabilidade celular entre esses hidrogéis e a CB. Entretanto, as amostras CB-20F e CB-40F apresentaram viabilidade inferior àquela da CB pura.

A redução da viabilidade celular para as amostras citadas e o aumento menos expressivo para CB-60G (c), comparada à CB-60F (a) e à CB-60T (d), estão relacionados com características e interações das

células à superfície do hidrogel e à presença de diferentes composições de *A. vera*. Como relatado anteriormente, a porosidade e topografia de cada hidrogel em particular tem as suas peculiaridades, e pode-se afirmar que em nanoescala isto é muito significativo para a sinalização celular.

A capacidade de adesão das células de fibroblasto L929 sobre os hidrogéis sintetizados foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e avaliadas qualitativamente. As Figuras 25, 26 e 27 mostram os resultados de adesão celular das células de fibroblastos L929 cultivados por 24 e 48 horas, respectivamente, sobre os hidrogéis de CB, CB-T, CB-G e CB-F nas composições de 20%, 40% e 60%.

Figura 25 – Adesão dos fibroblastos L929 cultivados sobre os hidrogéis de CB (a–b) e CB-F (c–h) em diferentes formulações após 24 e 48 horas de cultura *in vitro*.

Magnificações: 50 $\times$ , 200 $\times$ , 500 $\times$  e 1000 $\times$ .

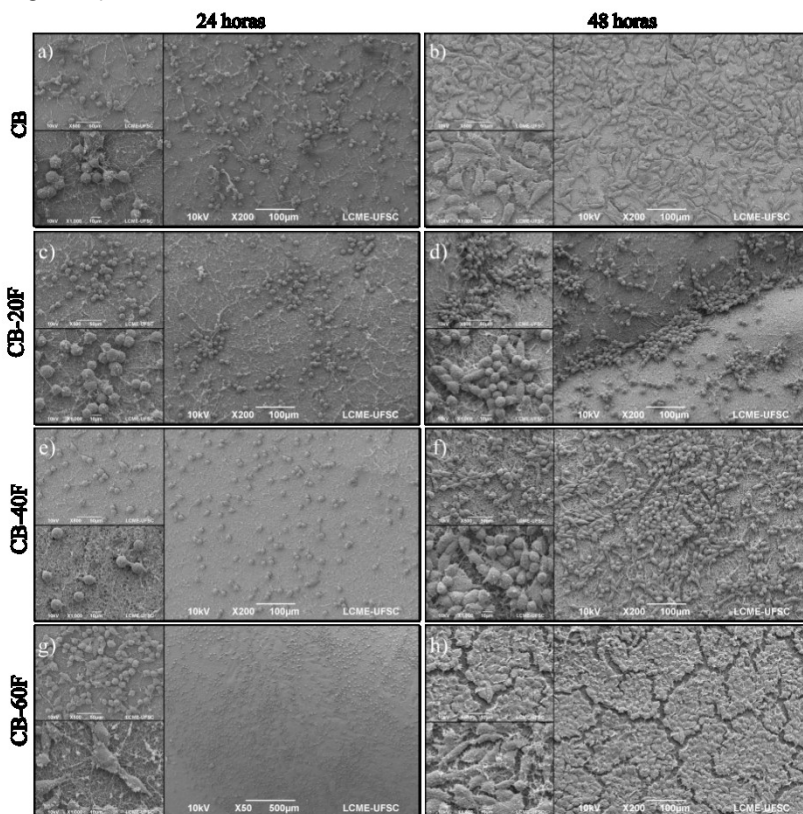
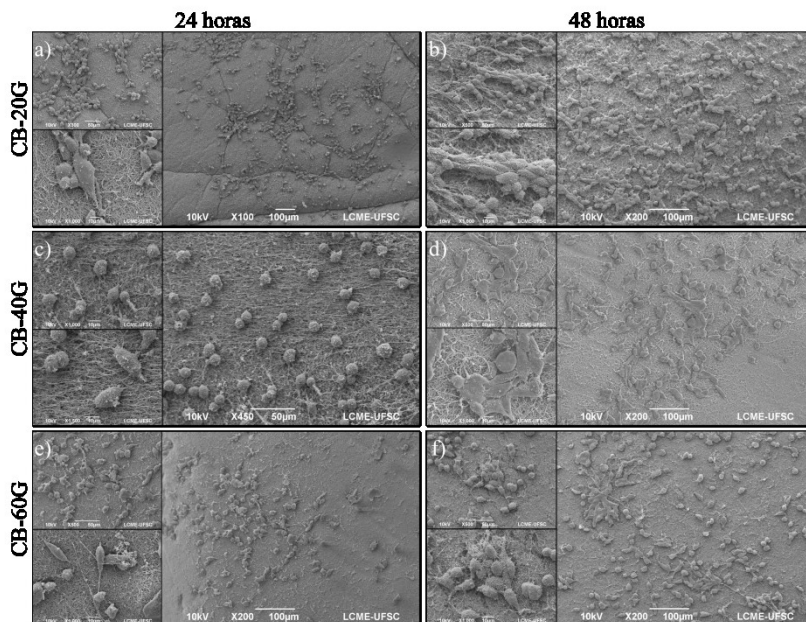


Figura 26 – Adesão dos fibroblastos L929 cultivados sobre os hidrogéis de CB-G em diferentes formulações (a–f) após 24 e 48 horas de cultura *in vitro*. Magnificações: 50×, 200×, 500× e 1000×.



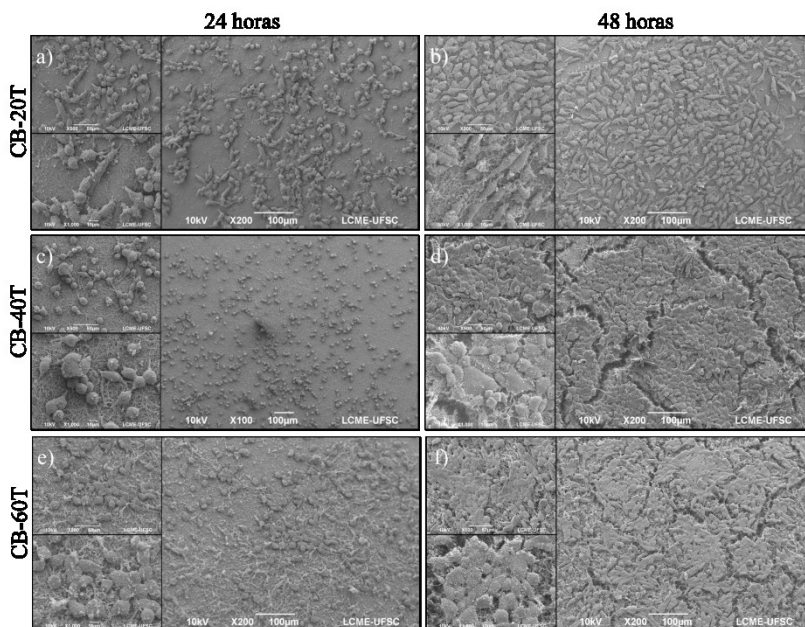
A adesão e a confluência celular observadas após 24 horas de cultura foram similares para as amostras CB, CB-20F, CB-40F (Figura 25 a, c, e respectivamente), CB-20G, CB-40G, CB-60G (Figura 26 a, c, e) e maior para as amostras CB-20T, CB-40T, CB-60T (Figura 27 a, c, e). Após 48 horas de cultura observa-se que as células proliferaram e alteraram o perfil de adesão e confluência celular, que variou em função da composição físico-química do material (Segunda coluna das Figuras 25, 26 e 27). As amostras CB, CB-60 F (Figura 25 b, e h), CB-20T, CB-40T, CB-60T (Figura 27 b, d e f) apresentaram maior quantidade de células proliferadas e aderidas sobre esses hidrogéis. Entretanto, os hidrogéis CB-20F, CB-40F (Figura 25 d e f), CB-20G, CB-40G e CB-60G (Figura 26 b, d e f) apresentaram menor quantidade de células proliferadas e aderidas em relação aos demais hidrogéis.

Em 24 horas de cultura as células aderidas sobre as membranas CB, CB-20F e CB-40F (Figura 25 a, c, e, respectivamente) apresentaram formato arredondado o que não foi observado para CB-60F (Figura 25

g), CB-20G, CB-40G, CB-60G (Figura 26 a, c, e), CB-20T, CB-40T e CB-60T (Figura 27 a, c, e). Após 48 horas, CB-60F (Figura 25 h), CB-40T e CB-60T (Figura 27 d, f) apresentaram um aumento expressivo da confluência celular, em relação às demais amostras. As células proliferaram rapidamente de forma consistente nestes hidrogéis, formando uma monocamada sobre as respectivas superfícies de contato. É importante salientar que as imagens de MEV foram obtidas em determinadas áreas do hidrogel e desta forma não podem ser comparados diretamente com os dados quantitativos do ensaio com MTS.

A presença de rachaduras sobre as membranas está possivelmente relacionada com a técnica de secagem realizada e à precipitação de alguns cristais oriundos da solução tampão fosfato salina (PBS) utilizada nas etapas prévias de lavagem das amostras para fixação com glutaraldeído.

Figura 27 – Adesão dos fibroblastos L929 cultivados sobre os hidrogéis de CB-T em diferentes formulações (a–f) após 24 e 48 horas de cultura *in vitro*. Magnificações: 50×, 200×, 500× e 1000×.



Devido à aparente adequação fisiológica demonstrada pelas células de fibroblasto frente aos hidrogéis CB-60F, CB-60T, CB-60G, quando avaliados após 48 horas de cultura (conforme os ensaios de citotoxicidade, viabilidade e adesão celular), estas amostras foram analisadas quanto à organização do citoesqueleto celular. Para tal, as células foram cultivadas sobre as respectivas superfícies (CB-60F, CB-60T, CB-60G) e caracterizadas por microscopia de fluorescência. O núcleo celular foi corado com DAPI (em azul) e o citoesqueleto (F-actina) com faloidina em vermelho (Figura 28). Para confirmação da viabilidade e integridade celular foi utilizado o kit de fluorescência Live/Dead<sup>®</sup>. O grupo controle (CB) também foi avaliado, paralelamente.

A Figura 28 mostra as células cultivadas nas amostras CB (a), CB-60F (b), CB-60G (c) e CB-60T (d). As células estão com o núcleo corado em azul (DAPI) e o citoesqueleto em vermelho (faloidina). Através da microscopia de fluorescência foi possível observar que as células cultivadas sobre os hidrogéis contendo porções de *A. vera* apresentam o citoesqueleto mais alongado e organizado do que quando cultivadas sobre a CB, com exceção das células cultivadas sobre o CB-60G. As células cultivadas sobre os hidrogéis CB-60T e CB-60-F possuem o citoesqueleto alongado o que é característico da fisiologia das células de fibroblastos, Figura 28 (b) e (e). A avaliação da morfologia celular apresentada pela interação célula-célula e célula-material, no que se refere à organização do citoesqueleto, evidencia que as membranas apresentam um microambiente propício para a proliferação e migração celular (NEAMNARK et al., 2007).

Os mesmos hidrogéis utilizados para avaliar a organização do citoesqueleto celular foram utilizados para comprovação da viabilidade celular, com base na sua atividade metabólica. Este ensaio fluorescente cora as células metabolicamente viáveis em verde (calceína), e as células mortas ou metabolicamente inativas em vermelho (iodeto de propídio). A Figura 29 mostra as células de fibroblastos L929 que permanecem metabolicamente ativas após 24 e 48 horas de cultura sobre os hidrogéis CB (a), CB-60F(b), CB-60G (c) e CB-60T (e). Através deste ensaio foi possível comprovar que o número de células metabolicamente ativas aumenta após 48 horas de cultura, principalmente para as células cultivadas sobre CB-60F e CB-60T (b, e respectivamente, segunda coluna). Estes resultados corroboram as observações realizadas quanto ao alongamento do citoesqueleto, o que comprova uma preferência das células de fibroblastos em relação aos hidrogéis sintetizados com as porções T e F nas maiores concentrações. Observa-se na Figura 29 que a quantidade de células mortas ou

metabolicamente inativas é insignificante em todos os hidrogéis testados, coradas em vermelho.

A primeira coluna (a–e) mostra que após 24 horas de cultura as células de fibroblastos metabolicamente viáveis, coradas em verde, se mantiveram em quantidades similares para as quatro amostras testadas. Entretanto, em 48 horas, as amostras CB-60F e CB-60T apresentaram qualitativamente um aumento da quantidade de células viáveis. A proliferação dos fibroblastos é importante nos processos de restauração tecidual, pois produzem componentes da matriz extracelular como as fibras de colágeno tipo I e III que conferem a resistência mecânica ao tecido epitelial (MUTSAERS et al., 1997). Estudos envolvendo o comportamento de fibroblastos sobre biomateriais incorporados com gel de *A. vera* e a aplicação do gel em lesões teciduais tem ressaltado que a presença de moléculas bioativas do gel potencializa a proliferação destas células. Entretanto, as biomoléculas responsáveis por influenciar os eventos celulares de adesão e proliferação não foram elucidadas devido à complexidade da mistura desses componentes bioativos no gel de *A. vera* (CHITHRA; SAJITHLAL CHANDRAKASAN, 1998c). Silva e colaboradores (2013) relataram o aumento da viabilidade celular de fibroblastos L929 cultivados sobre biomateriais de quitosana/*A. vera* em relação à mesma linhagem celular cultivada sobre quitosana. (SILVA; CARIDADE; et al., 2013; SILVA; POPA; et al., 2013). É possível que a influência desses componentes sobre os eventos celulares tenha maior efetividade na composição *in natura* devido ao efeito sinérgico desses compostos. Além das características químicas, a topografia da superfície onde as células foram cultivadas também influencia no comportamento celular e, ainda que análises detalhadas sobre esse comportamento e a correlação desse com as características químicas e topográficas da superfície não tenham sido realizadas, este estudo sugere que a incorporação de 60% de F ou T (CB-60F e CB-60T) na membrana de celulose pode influenciar positivamente a proliferação, adesão, viabilidade e morfologia celular.

Os resultados obtidos quanto ao cultivo das células de fibroblasto L929 cultivadas sobre os hidrogéis de CB contendo *A. vera* comprovam que estes hidrogéis não apresentaram citotoxicidade celular. Existe uma preferência proliferativa das células de fibroblastos L929 pelos hidrogéis sintetizados com 60% das porções T e F provenientes da *A. vera*. Estes resultados sugerem que os hidrogéis sintetizados podem servir de plataformas promissoras para aplicações na engenharia de tecidos da pele.

Figura 28 – Células de fibroblasto L929 cultivadas sobre os hidrogéis CB, CB-60T, CB-60F e CB-60G após 48 horas de cultura. Núcleo corado com DAPI (azul) e citoesqueleto com faloidina (vermelho).

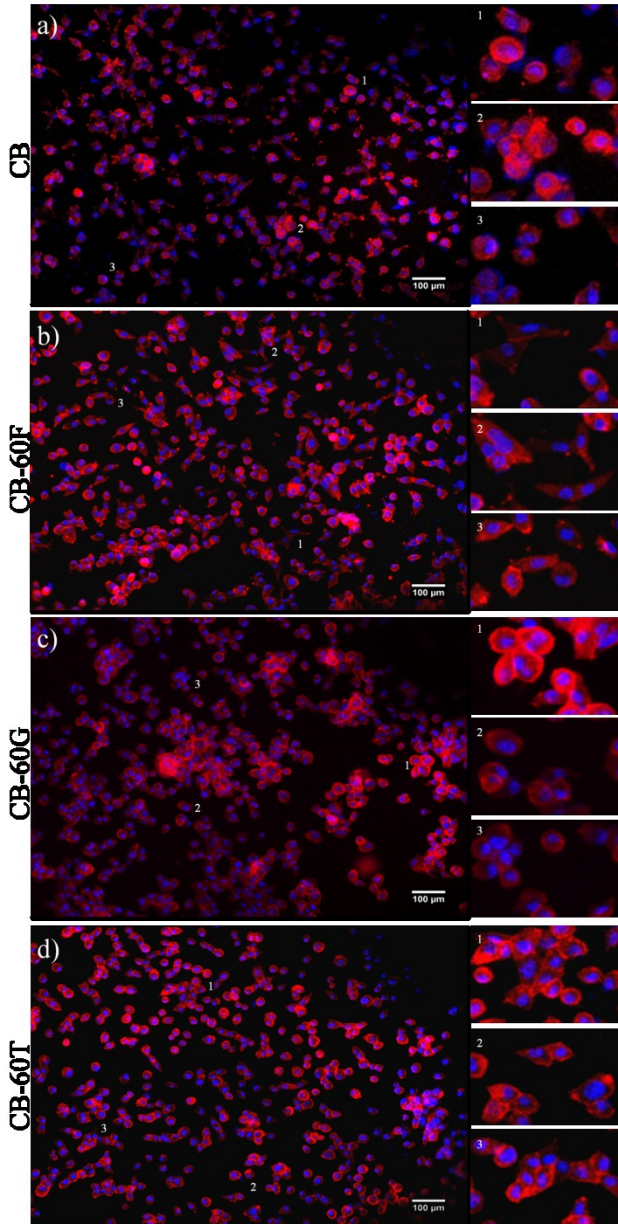
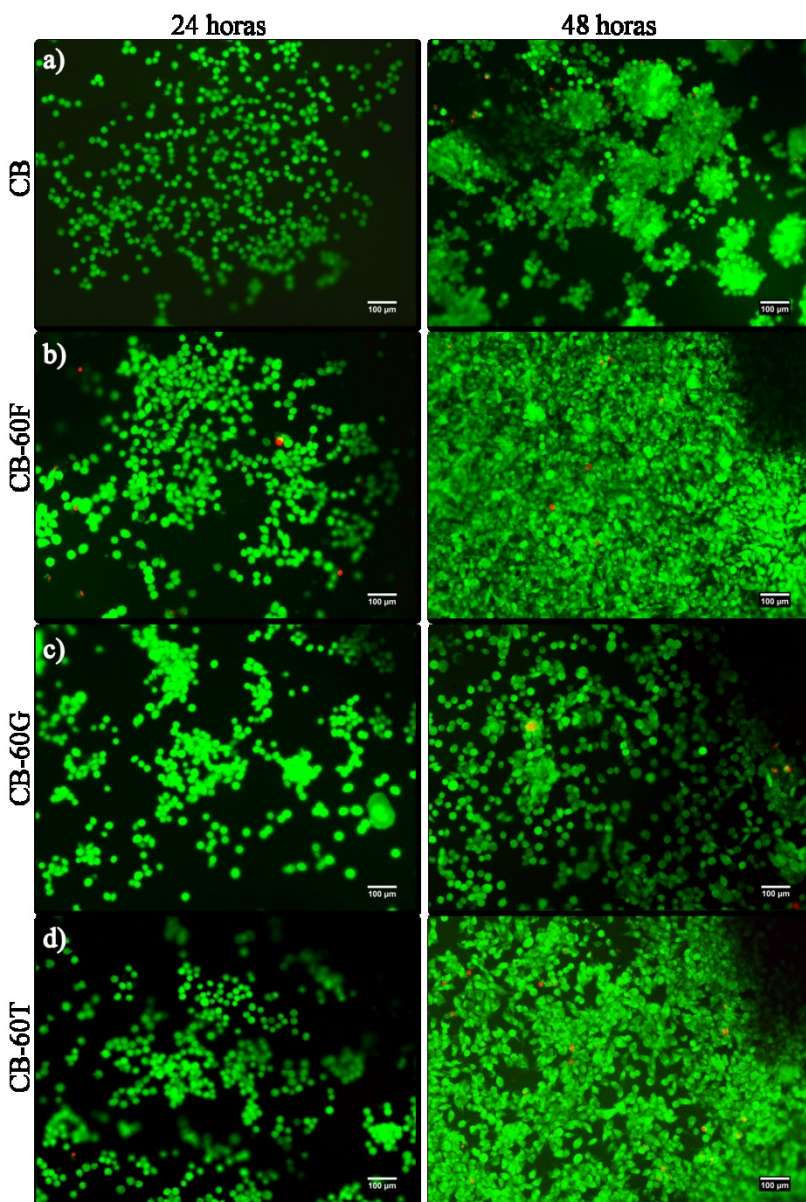




Figura 29 – Células de fibroblastos L929 que permanecem metabolicamente viáveis (coradas em verde) após 24 e 48 horas de cultivo sobre os hidrogéis CB (a), CB-60F (b), CB-60G (c) e CB-60T (e).



#### 4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

A suplementação do meio de cultura de síntese da CB com diferentes frações de *A. vera* (T, G e F) produziu, com sucesso, membranas com diferentes características microestruturais, com distintos diâmetros de fibras, alterações nos módulo de elasticidade, da extensibilidade dos hidrogéis, da cristalinidade, do tamanho do cristalito, da absorção de água e aumento da massa das membranas. Além disso, os espectros de FTIR sugerem que pode existir uma modificação química, conforme indicado pela presença das bandas em 1641 e 1547  $\text{cm}^{-1}$  e a sobreposição de diversas bandas abaixo da região de 1200  $\text{cm}^{-1}$  do infravermelho.

As análises *in vitro* evidenciaram que os hidrogéis compósitos são capazes de suportar a adesão e a viabilidade celular, no período de 48 horas, com aumento da proliferação celular e da interação célula-material. Os materiais CB-60F e CB-60T se mostraram promissores para serem utilizados como dispositivos biomédicos e aplicações na engenharia tecidual.

**CAPÍTULO 5**  
**CONCLUSÕES E SUGESTÕES FUTURAS**



## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES FUTURAS

### 5.1 CONCLUSÕES

Ainda que sejam utilizadas técnicas de esterilização com temperaturas de até 150°C, para a redução da carga microbiológica de produtos comerciais de gel de *Aloe vera*, esta técnica provoca a redução do teor de polissacarídeos, através da degradação por exposição a altas temperaturas, com propriedades biológicas de interesse (REYNOLDS, 2004). Neste trabalho, diferentes frações de *A. vera* foram esterilizadas por autoclave, a 121 °C por 30 minutos a uma pressão de 1,2 kgf, o que ainda assim pode ter contribuído para a redução do teor de polissacarídeos em virtude do longo tempo de exposição a altas temperaturas.

A técnica utilizada para identificação dos grupos funcionais da *A. vera* permitiu estimar a presença dos principais grupos após a esterilização, através da comparação com espectros existentes na literatura. No entanto, análises mais detalhadas são requeridas para identificação e quantificação de compostos isolados antes e após o processo de esterilização, bem como faz-se necessária a avaliação do processo de esterilização utilizado sobre a bioatividade desses compostos.

A suplementação *in situ* de frações diferentes de *A. vera* na produção dos compósitos CB-*A. vera* de diferentes proporções promove modificações microestruturais, mecânicas e físico-químicas observáveis, que podem ser de potencial interesse em diversas aplicações biomédicas. Dentre as três concentrações formuladas para cada fração, as suplementações com 60% (v/v) apresentaram modificações estruturais, mecânicas e químicas mais intensificadas nos hidrogéis produzidos, quando comparados com os demais compósitos formulados dentro de cada grupo. A formulação de 60% (v/v) de F e T revelou ser a mais bem sucedida no aumento da adesão, viabilidade e proliferação dos fibroblastos, capaz de melhorar a interação célula-material, quando comparadas com amostra de celulose bacteriana pura.

### 5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Para minimizar a degradação de polissacarídeos sensíveis à temperatura, pode-se utilizar técnicas alternativas de esterilização, como o plasma frio.

- A identificação e quantificação de proteínas e polissacarídeos podem ser realizadas através de métodos mais simples, como Bradford ou Dubois, respectivamente, ou técnicas mais avançadas como as cromatografias líquida e por exclusão de tamanho.
- Para identificar o teor aproximado de *A. vera* incorporado nos compósitos de CB-*A.vera* pode-se utilizar o teor de nitrogênio presente nos compósitos como marcador.
- A avaliação da rugosidade, porosidade, permeabilidade a vapor e análise quantitativa dos elementos presentes na superfície lisa dos compósitos poderão auxiliar na determinação dos fatores que afetam a interação célula-material.
- A cultura celular no lado poroso dos compósitos, com outras linhagens celulares poderá estender as possíveis aplicações deste material visando novos processos e produtos de engenharia tecidual.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDI, N.; CABRALES, L.; HAIGLER, C. H. Changes in the cell wall and cellulose content of developing cotton fibers investigated by FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 100, n. 0, p. 9-16, 2014.

ALVAREZ, K.; NAKAJIMA, H. Metallic Scaffolds for Bone Regeneration. **Materials**, v. 2, n. 3, p. 790-832, Sep 2009.

ARAÚJO, P. S. et al. Microporpagação de babosa (*Aloe vera* - *Liliaceae*). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 25, p. 54-56, 2002.

ARTZ, R. R. E. et al. FTIR spectroscopy can be used as a screening tool for organic matter quality in regenerating cutover peatlands. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 515-527, 2008.

ATALA, A.; KASPER, F. K.; MIKOS, A. G. Engineering Complex Tissues. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 160, Nov 14 2012.

BACKDAHL, H. et al. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2141-2149, Mar 2006.

BARUD, H. S. et al. Antimicrobial Bacterial Cellulose-Silver Nanoparticles Composite Membranes. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, 2011.

BEL MONDO BEAUTY, L. 100% Bio Cellulose Facial Sheet Masks. New Jersey, 2014. Disponível em: < <http://www.belmondobeauty.com/> >. Acesso em: 14/01.

BERTI, F. V. **Desenvolvimento de estruturas vasculares endotelizadas em Scaffolds de celulose bacteriana**. 2012. 147 p Doutorado Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

BERTI, F. V. et al. Nanofiber density determines endothelial cell behavior on hydrogel matrix. **Materials Science and Engineering: C**, n. 0,

BERTI, F. V. et al. Nanofiber density determines endothelial cell behavior on hydrogel matrix. **Materials Science and Engineering: C**, n. 0, 2013.

BILL H. MCANALLEY, G. P. T. X. **Process for preparation of aloe products, products produced thereby and compositions thereof**US. US 4735935.

BILL H. MCANALLEY, G. P. T. X. **Processes for preparation of aloe products, products produced thereby and compositions thereof**US. US 4917890.

BOERIU, C. G. et al. Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. **Industrial Crops and Products**, v. 20, n. 2, p. 205-218, 2004.

BORGES, A. M. G. et al. Polymer films with surfaces unmodified and modified by non-thermal plasma as new substrates for cell adhesion. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 3, p. 1315-1324, 2013.

BROWN, R. M.; WILLISON, J. H. M.; RICHARDSON, C. L. Cellulose Biosynthesis in *Acetobacter-Xylinum* - Visualization of Site of Synthesis and Direct Measurement of In vivo Process. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 12, p. 4565-4569, 1976.

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**. 2007. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia., Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

CAMPESTRINI, L. H. et al. NMR and rheological study of Aloe barbadensis partially acetylated glucomannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 511-519, Apr 15 2013.

CARREIRA, P. et al. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 15, p. 7354-7360, 2011.

CÉLINO, A. et al. Qualitative and quantitative assessment of water sorption in natural fibres using ATR-FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 0, p. 163-170, 2014.



- CHAWLA, P. R. et al. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107-124, Apr-Jun 2009.
- CHIAOPRAKOBKIJ, N. et al. Characterization and biocompatibility of bacterial cellulose/alginate composite sponges with human keratinocytes and gingival fibroblasts. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 548-553, 2011.
- CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G. B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of Aloe vera on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 181, n. 1-2, p. 71-76, Apr 1998a.
- CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G. B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of Aloe vera on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 59, n. 3, p. 179-186, Jan 1998b.
- CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G. B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of aloe vera on the healing of dermal wounds in diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 59, n. 3, p. 195-201, Jan 1998c.
- CHOI, S.; CHUNG, M.-H. A review on the relationship between aloe vera components and their biologic effects. **Seminars in Integrative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 53-62, 2003.
- CHOW, J. T. N. et al. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of Aloe vera L. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 6, p. 1131-1142, May 2 2005.
- CLARK, R. A. F. Chapter 76 - Wound Repair: Basic Biology to Tissue Engineering. In: LANZA, R. et al. (Ed.). **Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)**. Boston: Academic Press, 2014. p.1595-1617.
- COLOM, X. et al. Structural analysis of photodegraded wood by means of FTIR spectroscopy. **Polymer Degradation and Stability**, v. 80, n. 3, p. 543-549, Jun 2003.
- CZAJA, W. et al. Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145-151, Jan 2006.

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

DANHOF, I. E.; MCANALLEY, B. H. Stabilized Aloe Vera - Effect on Human-Skin Cells. **Drug & Cosmetic Industry**, v. 133, n. 2, p. 52-&, 1983.

DÉLÉRIS, G.; PETIBOIS, C. Applications of FT-IR spectrometry to plasma contents analysis and monitoring. **Vibrational Spectroscopy**, v. 32, n. 1, p. 129-136, 2003.

DHANDAYUTHAPANI, B. et al. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. **International Journal of Polymer Science**, 2011.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337-4351, Nov 2003.

DVIR, T. et al. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. **Nature Nanotechnology**, v. 6, n. 1, p. 13-22, Jan 2011.

ESUA, M. F.; RAUWALD, J. W. Novel bioactive maloyl glucans from Aloe vera gel: isolation, structure elucidation and in vitro bioassays. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 3, p. 355-364, Feb 27 2006.

FEMENIA, A. et al. Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from Aloe barbadensis Miller. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, n. 4, p. 397-405, 2003.

FEMENIA, A. et al. Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) plant tissues. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, n. 2, p. 109-117, 1999.

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

FONTANA, J. D. et al. Acetobacter Cellulose Pellicle as a Temporary Skin Substitute. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24-5, p. 253-264, Spr-Sum 1990.

FU, L. et al. **Bacterial Cellulose for Skin Repair Materials**. 2011.

FU, L. N.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432-1442, Feb 15 2013.

GEORGE, J. et al. Physico-mechanical properties of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) cellulose membrane. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n. 8-9, p. 1323-1327, Dec 2005.

GONÇALVES, V. Z. **Estudo de viabilidade técnica, econômica e financeira da extração e comercialização de um insumo farmacêutico a base de polissacarídeos de Aloe barbadensis Miller**. 2008. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Florianópolis, SC.

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

GRINDLAY, D.; REYNOLDS, T. The Aloe-Vera Phenomenon - a Review of the Properties and Modern Uses of the Leaf Parenchyma Gel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 16, n. 2-3, p. 117-151, Jun 1986.

GRUENWALD, J. Novel botanical ingredients for beverages. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 2, p. 210-216, 2009.

GUO, J.; CATCHMARK, J. M. Surface area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhiskers and cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1026-1037, Jan 15 2012.

HAMMAN, J. H. Composition and applications of Aloe vera leaf gel. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1599-1616, Aug 2008.

HELENIUS, G. et al. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 76A, n. 2, p. 431-438, Feb 2006.

HENRY, R. An updated review of aloe vera. **Cosmetic and Toiletries**, v. 94, p. 42-50, 1979.

HIGHTON, L.; WALLACE, C.; SHAH, M. Use of Suprathel (R) for partial thickness burns in children. **Burns**, v. 39, n. 1, p. 136-141, Feb 2013.

HONG, F.; QIU, K. An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter acetii* subsp. *xylinus* ATCC 23770. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 3, p. 545-549, 2008.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, v. 35, n. 2, p. 261-270, Jan 2000.

JITHENDRA, P. et al. Preparation and Characterization of Aloe Vera Blended Collagen-Chitosan Composite Scaffold for Tissue Engineering Applications. **ACS Appl Mater Interfaces**, Jul 22 2013.

KACURAKOVA, M. et al. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, n. 2, p. 195-203, Oct 2000.

KACURAKOVA, M. et al. Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 12, p. 1145-1153, Jun 12 2002.

KAČURÁKOVÁ, M. et al. Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 12, p. 1145-1153, 2002.

KHOSHGOZARAN-ABRAS, S. et al. Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan based-films as a function of Aloe vera gel incorporation. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 2058-2062, Feb 14 2012.

KIM, J. et al. Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/Chitosan composite for potential biomedical application. **Journal of Polymer Research**, v. 18, n. 4, p. 739-744, 2011/07/01 2011.

KLEIN, A. D.; PENNEYS, N. S. Aloe vera. **J Am Acad Dermatol**, v. 18, n. 4 Pt 1, p. 714-20, Apr 1988.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.

KLEMM, D. et al. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1561-1603, Nov 2001.

KLEMM, D. O. Selective syntheses, novel products and designed biomaterials in cellulose chemistry. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 229, p. U301-U301, Mar 13 2005.

KNILL, C. Handbook of Fourier Transform Raman and Infrared Spectra of Polymers A.H. Kuptsov and G.N. Zhizhin. **Bioseparation**, v. 9, n. 1, p. 55-55, 2000/01/01 2000.

KRETZSCHMAR, G. et al. Oligosaccharide recognition by selectins: Synthesis and biological activity of multivalent sialyl lewis-X ligands. **Tetrahedron**, v. 51, n. 47, p. 13015-13030, 1995.

LAMMERS, K.; ARBUCKLE-KEIL, G.; DIGHTON, J. FT-IR study of the changes in carbohydrate chemistry of three New Jersey pine barrens leaf litters during simulated control burning. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 340-347, 2009.

LIN, W.-C. et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 603-611, 2013.

LIN, Y. K. et al. Effects of different extracellular matrices and growth factor immobilization on biodegradability and biocompatibility of macroporous bacterial cellulose. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 26, n. 5, p. 508-518, Sep 2011.

MACNEIL, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 874-880, Feb 22 2007.

MANEERUNG, T.; TOKURA, S.; RUJIRAVANIT, R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 43-51, Apr 3 2008.

MCANALLEY, B. H. 4602 Chackl Court, Grand Praire, TX 75052. **Process for preparation of Aloe productts products produced thereby and composition thereof** A61K 35/78, 31/715, 31/72. US. WO 87/00052. 20.06.1986, 15.01.1987. World Intelctual Property Organization. p.156.

METCALFE, A. D.; FERGUSON, M. W. J. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. **Biomaterials**, v. 28, n. 34, p. 5100-5113, Dec 2007a.

METCALFE, A. D.; FERGUSON, M. W. J. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 4, n. 14, p. 413-437, Jun 22 2007b.

MIRANDA, M. et al. Effect of temperature on structural properties of Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) gel and Weibull distribution for modelling drying process. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. C2-3, p. 138-144, Jul-Sep 2010.

MOONMANGMEE, S. et al. A novel polysaccharide involved in the pellicle formation of Acetobacter aceti. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 2, p. 192-200, 2002.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; UR REHMAN, D. I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 134-179, 2008/02/01 2008.

MULLER, D. et al. Structure and properties of polypyrrole/bacterial cellulose nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 655-662, Apr 15 2013.

MULLER, D. et al. Chemical in situ polymerization of polypyrrole on bacterial cellulose nanofibers. **Synthetic Metals**, v. 161, n. 1-2, p. 106-111, Jan 2011.

MUTSAERS, S. E. et al. Mechanisms of tissue repair: From wound healing to fibrosis. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 29, n. 1, p. 5-17, Jan 1997.

NEAMNARK, A. et al. In vitro biocompatibility evaluations of hexanoyl chitosan film. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 1, p. 166-172, Mar 1 2007.

NI, Y. et al. Isolation and characterization of structural components of Aloe vera L. leaf pulp. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 14, p. 1745-1755, Dec 20 2004.

NIEDUSZY.I.; PRESTON, R. D. Crystallite Size in Natural Cellulose. **Nature**, v. 225, n. 5229, p. 273-&, 1970.

OH, S. Y. et al. FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 3, p. 417-428, Feb 28 2005.

PALSSON, B.; BHATIA, S. **Tissue Engineering**. Science Press, 2004.

PARKS, L. M.; ROWE, T. D. A phytochemical study of Aloe vera leaf. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 30, n. 10, p. 262-266, 1941.

PECORARO, É. et al. Bacterial cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: preparation, properties and applications. **Monomers, polymers and composites from renewable resources**, p. 369, 2008.

PEREIRA, R.; MENDES, A.; BÁRTOLO, P. Alginate/Aloe Vera Hydrogel Films for Biomedical Applications. **Procedia CIRP**, v. 5, n. 0, p. 210-215, 2013.

PEREIRA, R. et al. Preparation and Characterization of Films Based on Alginate and Aloe Vera. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 16, n. 7, p. 449-464, 2011.

PERTILE, R. A. N. et al. Surface modification of bacterial cellulose by nitrogen-containing plasma for improved interaction with cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 692-698, 2010.

PETIBOIS, C. et al. Differentiation of populations with different physiologic profiles by plasma Fourier-transform infrared spectra classification. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 137, n. 3, p. 184-190, Mar 2001.

PORTO, L. M. et al. **Corpos tridimensionais de celulose bacteriana, processo de produção e uso dos mesmos Brasil**.

PORTO, L. M. et al. **Biomaterial composto celulose bacteriana-acemanana, processo de produção e uso dos mesmos** Brasil.

RAJASEKARAN, S. et al. Beneficial effects of Aloe vera leaf gel extract on lipid profile status in rats with streptozotocin diabetes. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 3, p. 232-237, Mar 2006.

RAMBO, C. R. et al. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, n. 4, p. 549-554, May 1 2008.

RAY, A. et al. Chemometric studies on mineral distribution and microstructure analysis of freeze-dried Aloe vera L. gel at different harvesting regimens. **Industrial Crops and Products**, v. 51, n. 0, p. 194-201, 2013.

RECOUVREUX, D. D. O. S. **Desenvolvimento de novos biomateriais baseados em celulose bacteriana para aplicações biomédicas e de engenharia de tecidos**. 2008. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Florianópolis, SC.

RECOUVREUX, D. O. S. et al. Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 2, p. 151-157, 2011.

REYNOLDS, T. **Aloes : the genus Aloe**. Boca Raton, Fla. ; London: CRC Press, 2004. xvi, 386 p.

REYNOLDS, T.; DWECK, A. C. Aloe vera leaf gel: a review update. **J Ethnopharmacol**, v. 68, n. 1-3, p. 3-37, Dec 15 1999.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Williams & Wilkins, 1996.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, V. M. et al. Effects of pasteurization on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from Aloe barbadensis Miller. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1675-1683, 2011.



RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, V. M. et al. Functional properties of pasteurized samples of *Aloe barbadensis* Miller: Optimization using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 225-232, 2012.

ROLLER, S.; DEA, I. C. M. Biotechnology in the Production and Modification of Biopolymers for Foods. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 261-277, 1992.

SAIBUATONG, O. A.; PHISALAPHONG, M. Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 455-460, Jan 20 2010.

SALTZMAN, W. M.; KYRIAKIDES, T. R. Chapter 20 - Cell Interactions with Polymers. In: LANZA, R. et al. (Ed.). **Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)**. Boston: Academic Press, 2014. p.385-406.

SANGEETHA, G.; RAJESHWARI, S.; VENCKATESH, R. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by aloe barbadensis miller leaf extract: Structure and optical properties. **Materials Research Bulletin**, v. 46, n. 12, p. 2560-2566, 2011.

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

SEAL, B. L.; OTERO, T. C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Materials Science & Engineering R-Reports**, v. 34, n. 4-5, p. 147-230, Oct 10 2001.

SHEZAD, O. et al. Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 1, p. 173-180, 2010.

SILVA JÚNIOR, A. **Essentia herba – Plantas bioativas**. Florianópolis: EPAGRI, 2003.

SILVA, S. S. et al. Effect of crosslinking in chitosan/aloe vera-based membranes for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 581-588, 2013.

SILVA, S. S. et al. An investigation of the potential application of chitosan/aloe-based membranes for regenerative medicine. **Acta Biomater**, v. 9, n. 6, p. 6790-7, Jun 2013.

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

STUMPF, T. R. et al. Enriched glucose and dextrin mannitol-based media modulates fibroblast behavior on bacterial cellulose membranes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 13, n. 8, 2013.

SUH, J. K. F.; MATTHEW, H. W. T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2589-2598, Dec 2000.

SVENSSON, A. et al. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, v. 26, n. 4, p. 419-431, Feb 2005.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 6, p. S311-S324, Jun 6 2009.

TAKZARE, N. et al. Influence of Aloe Vera Gel on Dermal Wound Healing Process in Rat. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 19, n. 1, p. 73-77, 2009.

TANG, W. H. et al. The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 125-131, Jan 2010.

TOKOH, C. et al. Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of acetyl glucomannan. **Cellulose**, v. 5, n. 4, p. 249-261, Dec 1998.

TOKOH, C. et al. Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of plant cell wall polysaccharides. **Cellulose**, v. 9, n. 1, p. 65-74, Mar 2002a.

TOKOH, C. et al. CP/MAS (13)C NMR and electron diffraction study of bacterial cellulose structure affected by cell wall polysaccharides. **Cellulose**, v. 9, n. 3-4, p. 351-360, 2002b.

TYLER, V. E. A history of pharmacy: future opportunities. **Pharm Hist**, v. 35, n. 4, p. 163-8, 1993.

UL-ISLAM, M. et al. Effects of glucuronic acid oligomers on the production, structure and properties of bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 360-366, Jan 30 2013.

UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; PARK, J. K. Nanoreinforced bacterial cellulose–montmorillonite composites for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1189-1197, 2012.

UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; PARK, J. K. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 596-603, Apr 2 2012.

VALEPYN, E.; BEREZINA, N.; PAQUOT, M. Optimization of Production and Preliminary Characterization of New Exopolysaccharides from *Gluconacetobacter hansenii* LMG1524. **Advances in Microbiology**, v. 2, p. 488-496, 2012.

WATANABE, K. et al. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. **Cellulose**, v. 5, n. 3, p. 187-200, Sep 1998.

WHITNEY, S. E. C. et al. Structural aspects of the interaction of mannan-based polysaccharides with bacterial cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 307, n. 3-4, p. 299-309, Feb 1998.

WHO. **World Health Organization monographs on selected medicinal plants**. Geneva: World Health Organization, 1999. 289

WIPPERMANN, J. et al. Preliminary Results of Small Arterial Substitute Performed with a New Cylindrical Biomaterial Composed of Bacterial Cellulose. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 37, n. 5, p. 592-596, 2009.

WONG, T.; MCGRATH, J. A.; NAVSARIA, H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. **British Journal of Dermatology**, v. 156, n. 6, p. 1149-1155, Jun 2007.

YAMANAKA, S. et al. Production, property, and application of bacterial cellulose. **Nippon Nogeikagaku Kaishi-Journal of the Japan Society for**

**Bioscience Biotechnology and Agrochemistry**, v. 72, n. 9, p. 1039-1044, Sep 1998.

YAMANAKA, S. et al. The Structure and Mechanical-Properties of Sheets Prepared from Bacterial Cellulose. **Journal of Materials Science**, v. 24, n. 9, p. 3141-3145, Sep 1989.

YANG, L. et al. FT-IR spectroscopic study on the variations of molecular structures of some carboxyl acids induced by free electron laser. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 62, n. 4-5, p. 1209-1215, 2005.

YANG, S. F. et al. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part 1. Traditional factors. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 6, p. 679-689, Dec 2001.

YI, Y. et al. Structural features and immunomodulatory activities of polysaccharides of longan pulp. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 636-643, Jan 4 2012.

YOUNG IN PARK; LEE, S. K. **New perspectives on Aloe**. New York: Springer US, 2006.

ZABOROWSKA, M. et al. Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 7, p. 2540-2547, 2010.

ZHANG, L. N.; 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. 119-128, Nov 1996.

ZIMMERMANN, K. A. et al. Biomimetic design of a bacterial cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone healing applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 1, p. 43-49, 2011.