



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

CHARLES KONDAGESKI

**COMPÓSITO POLIMÉRICO DE NANOCELULOSE
BACTERIANA E POLI(ÁCIDO L-LÁCTICO-CO-TRIMETILENO
CARBONATO) PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

FLORIANÓPOLIS

2016

CHARLES KONDAGESKI

COMPÓSITO POLIMÉRICO DE NANOCELULOSE BACTERIANA
E POLI(ÁCIDO L-LÁTICO-CO-TRIMETILENO CARBONATO)
PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Coorientador: Prof. Dr. Roger Walz

Florianópolis
2016

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

Kondageski, Charles

COMPÓSITO POLIMÉRICO DE NANOCELULOSE BACTERIANA E
POLI(ÁCIDO L-LÁTICO-CO-TRIMETILENO CARBONATO) PARA
APLICAÇÕES BIOMÉDICAS / Charles Kondageski ; orientador, Luismar
Marques Porto ; coorientador, Roger Walz - Florianópolis, SC, 2016.

134 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. tissue engineering. 3. bacterial cellulose. 4.
PLLA/TMC. 5. Mieloeningoceles. I. Porto, Luismar Marques. II. Walz, Roger.
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química. IV. Título.

**COMPÓSITO POLIMÉRICO DE NANOCELULOSE
BACTERIANA E POLI(ÁCIDO L-LÁCTICO-CO-TRIMETILENO
CARBONATO) PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Por

Charles Kondageski

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Prof. Dr. Luismar Marques
Porto
Orientador

Prof. Dr. Roger Walz
Coorientador

Profa. Dr^a. Cíntia Soares
Coordenador do POSENQ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Orientador, Presidente

Dr. Aguedo Aragones
Membro Externo

Prof. Dr. Carlos Renato Rambo
Membro Externo

Prof. Dr. Marcelo Neves Linhares
Membro Externo

Profa. Dr^a Katia Lin
Membro Externo

Dr. Jerônimo Buzetti Milano
Membro Externo

If the machine produces tranquillity it's right. If it disturbs you it's wrong until either the machine or your mind is changed. The test of the machine's always your own mind. There isn't any other test.

Robert M. Pirsig

Dedico este trabalho a minha amada esposa Susan, alegria dos meus dias.

AGRADECIMENTOS

Sem a genuína e gentil cooperação das diversas pessoas que se envolveram com este trabalho, ele não teria se realizado. Por mais extensa que o seja, esta lista será sempre incompleta e, desde já, peço desculpas pelas omissões.

Ao Prof. Dr. Luismar Marques Porto, cujo pensamento de vanguarda científica, intelecto e coragem são inspiradores. Obrigado também pela oportunidade única de interação com um grupo de pesquisa multidisciplinar;

Ao Prof. Dr. Roger Walz, pela objetividade e o fazer ciência de maneira tão competente e consistente;

Ao Dr Aguedo Aragonés, por toda a ajuda na concepção dos biopolímeros explorados nesta tese e por sua disponibilidade e suporte irrestritos.;

Ao Prof. Dr. Carlos Rambo e à Dra. Daliana Mueller, pela ajuda com as análises de perfilometria e também, o meu obrigado pelo incentivo e bons conselhos;

Aos colegas do Intelab: Guilherme, Emily, Maikon, Samara, Camila Quinetti, Alencar, Giovana e Karla, pelo companheirismo, conviabilidade e inestimável auxílio nos vários ensaios, gráficos, planos de estudo e interpretações;

À Camila Schroeder pela ajuda com a realização dos ensaios *in vitro*;

Às Doutoradas Fernanda Vieira Berti, Julia Vasconcelos e Andrea Pimenta pela disponibilidade e análises críticas, sempre construtivas, durante a realização de experimentos, seminários, discussões e interpretação de dados;

Aos alunos de iniciação científica Raul, Sara e Leticia pela dedicação e ajuda com os vários trabalhos experimentais;

À doutoranda Karina Cesca, pela imensa ajuda em várias das atividades de pesquisa relacionadas a esta tese: ensaios experimentais, estudos *in vitro*, tabulação de dados e discussão de resultados. O seu domínio sobre as nuances das diversas atividades e rotinas de laboratório é amplo, assim como sua disponibilidade e intenção de ajudar, sempre e sem restrições. O meu sincero agradecimento e admiração pela sua generosidade e zelo pelo o que faz;

À doutoranda Amanda Reitenbach, pelo o auxílio e companheirismo durante as disciplinas cursadas nas fases iniciais do programa de doutorado;

À Eliana, Susane e Katyna, do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) UFSC, pelo conhecimento técnico, assistência e incentivo durante as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura e microscopia confocal, o meu muito obrigado;

Ao Leandro por toda a disponibilidade, ajuda e diligência durante os ensaios de caracterização de materiais realizados na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química da UFSC;

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSC Edevilson Silva, por toda a paciência, auxílio e gentileza durante as várias demandas administrativas do programa. Muito obrigado também pela ajuda com a diagramação do manuscrito final;

Aos colegas do Laboratório de ciências médicas: Dr. Alexandre Hoeller, Dr. Marcelo Liborio Schwarzwald e Dr. Marcelo Duzzioni, por toda a cooperação e dedicação com a realização de estudos paralelos a esta tese. Obrigado também pelo excelente convívio;

Ao Prof. Dr. Jean Costa Nunes e Fernanda Nunes, pela inestimável ajuda, inquestionável competência, rapidez e dedicação com as análises histológicas realizadas no contexto de estudos adicionais a esta tese;

Aos colegas, e amigos, neurocirurgiões pertencentes à clínica de Neurocirurgia Neuron: Doutores Iraê Ruhland, Athos T. Andrade de Athayde Jr, Antônio A. M. Mussi, Marcelo Neves Linhares, Daniel Santos Sousa, Jorge L. W. Moritz, Wuilker K. Campos e Willian Costa Baía Jr, bem como aos Doutores Humberto K Schroeder e César M. Guiotoku do Hospital Santa Catarina de Blumenau; obrigado pelo companheirismo, pelo incentivo, pela compreensão e ajuda durante os inevitáveis períodos durante os quais precisei me ausentar das nossas atividades assistenciais;

Ao Dr Irineu May Brodbeck, neurocirurgião pediátrico, empreendedor e visionário, que com o seu brilhantismo, talento administrativo e caráter tem mostrado que as pessoas podem mais e melhor, geram riqueza e deixam legados;

Aos “pequenos” pacientes acometidos por disrafismos, e suas famílias, razão maior para a realização deste estudo;

À Susan, minha esposa, muito obrigado por transformar meus dias com sua beleza e ternura. Minha companheira de todas as horas, agradeço pela firmeza de princípios, pela capacidade de organização e pelo irrestrito apoio e compreensão durante as horas mais difíceis;

A minha irmã Sheila, meu cunhado Marcelo e minhas adoráveis sobrinhas Manuela e Isabelle. Obrigado pelo carinho e torcida, me desculpem pelos momentos de ausência;

Aos meus pais, Nilda e David, exemplos de perseverança e integridade que, com muito esforço, puderam me proporcionar a formação educacional e profissional que obtive. Porém, mais do que condições para exercer uma profissão, eles me mostraram o caminho do respeito a si mesmo e ao espaço de outrem. Tenho muito orgulho de vocês e a minha gratidão é infinita.

Muito obrigado mãe e pai!

RESUMO

Os disrafismos espinhais são graves malformações da medula espinhal que desorganizam o tecido nervoso medular e o mantêm em comunicação com meio externo, incorrendo em inúmeras limitações aos pacientes acometidos, incluindo paralisias e hidrocefalia. O tratamento deve ser cirúrgico e precoce após o nascimento, porém a cirurgia pré-natal traz melhores resultados. Quando realizadas por técnica endoscópica, as correções demandam a utilização de biomateriais para o fechamento dos defeitos dorsais. A nanocelulose bacteriana (BNC) apresenta grande potencial em diversas aplicações biomédicas, sendo atualmente também empregada para a correção cirúrgica intrauterina dos disrafismos. No entanto, quando a sutura da pele não é possível, há necessidade da associação da celulose com materiais que sejam impermeáveis à água. Neste ensejo, foi concebido um novo biocompósito, nanopolimérico, combinando a BNC com o poli(L-ácido láctico-co-trimetileno carbonato) (PLLA/TMC). Os compósitos foram produzidos através da técnica de imersão e evaporação do solvente, e caracterizados quanto a permeabilidade à água, degradação, morfologia, composição química, comportamento térmico, propriedades mecânicas, topografia, grau de molhabilidade, hidratação, ensaio de citotoxicidade com fibroblastos L929 e adesão e proliferação de queratinócitos humanos (HaCaT). Os compósitos de BNC-PLLA/TMC resultaram em finas e homogêneas membranas, cujas matrizes poliméricas, à microscopia eletrônica de varredura (MEV), se demonstraram bastante integradas entre si. Ademais, os compósitos caracterizados foram impermeáveis à água, resistentes, flexíveis e estáveis termicamente. A modificação de uma das suas superfícies acrescentou maior rugosidade e hidrofiliabilidade. Os ensaios *in vitro* não demonstraram citotoxicidade para quaisquer das combinações das matrizes poliméricas, enquanto que os estudos de adesão e proliferação de queratinócitos humanos (HaCaT), evidenciaram compatibilidade celular com todos os biomateriais. A adesão celular seguiu um padrão dual: pequenos grupamentos celulares difusamente localizados sobre as membranas de BNC e junto às porções modificadas dos compósitos; e adesão segmentar, de áreas celulares mais amplas e hipercelulares, recorrente nas blendas de PLLA/TMC, nos compósitos originais e nos compósitos modificados de BNC-PLLA/TMC nas suas porções periféricas. Dadas as suas características, e compatibilidade celular, os compósitos desenvolvidos apresentam

potencial para a regeneração tecidual da pele, mais especificamente para a correção de disrafismos espinhais no período intrauterino.

Palavras-chave: engenharia tecidual, celulose bacteriana, PLLA/TMC, mielomeningoceles, cirurgia intraútero.

ABSTRACT

Spinal dysraphisms are serious malformations of the spinal cord that disrupt the spinal cord tissue and keep it exposed to the external environment, incurring numerous limitations to the patients, including paralysis and hydrocephalus. Treatment should always be surgical, but recently it was found that surgery performed during the prenatal period reported better results than post partum. When done endoscopically, patches and sheets are always necessary for the complete closure of the defects. Bacterial nanocellulose (BNC) has great potential in various biomedical applications, including intrauterine surgical correction of dysraphisms, however, due to the likelihood of cerebrospinal and amniotic fluid leakage, a second patch is usually required to achieve correction. To address this, BNC was combined with poly (L-lactide-co-trimethylene carbonate) (PLLA/TMC), to form a new composite. The composite was produced through dip coating technique, and was studied regarding its permeability to water, polymer degradation, morphology, spectroscopy studies, thermal behavior, mechanical performance, surface roughness, wetting properties, water uptake, cytotoxicity studies with L929 rat fibroblasts as well as adhesion and proliferation studies with human keratinocytes (HaCaT). The BNC-PLLA/TMC composites became thin and homogeneous membranes, whose polymer matrices have proven quite integrated under Scanning Electronic Microscopy. Furthermore, the new composites were characterized as being waterproof, resistant to traction, flexible and thermally stable. The modification of one of its surfaces added greater roughness, hydrophilicity and water up taking capacity to the final membranes. *In vitro* assays with mouse L929 fibroblasts showed no cytotoxicity for any combinations of the polymer matrices. *In vitro* adhesion and proliferation studies of human keratinocytes (HaCaT) demonstrated compatibility with all materials. Nonetheless, regarding cellular adhesion, 2 patterns were identified: first, exhibiting small clusters of keratinocytes distributed within most of the BNC membranes and central parts of the modified composites; second, expressing wider and hypercellular areas of cell adherence to the surface of PLLA / TMC blends, to the original composite and to the peripheral portions of the modified BNC-PLLA/TMC composites. These results indicate that the composite developed has great potential for tissue regeneration of the skin, specifically in cases of correction of dysraphisms in the intrauterine period.

Keywords: tissue engineering, bacterial cellulose, PLLA/TMC, myelomeningoceles, prenatal repair.

Este trabalho é parte integrante das pesquisas realizadas pelo Grupo de Engenharia de tecidos, coordenado pelo Prof. Dr. Luismar Marques Porto, e foi desenvolvido nos Laboratórios InteLab - Laboratório de Tecnologias Integradas, Departamento de Engenharia Química, e Cermat – Núcleo de Pesquisas em Materiais Cerâmicos e Compósitos, Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Santa Catarina.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estruturação do trabalho.....42
- Figura 2 - Aspectos anatômicos dos disrafismos abertos. Em: A) representação gráfica do aspecto dorsal (esquerda) e sagital (direita) da medula espinal exposta através do defeito cutâneo; B) aspecto dorsal de mielomeningocele rota ao nascimento.....44
- Figura 3 - Diagnóstico fetoscópico e clínico dos disrafismos abertos. Em: A) esquema demonstrando o acesso endoscópico; B) imagem por fetoscopia demonstrando o defeito espinal; C) imagem de mielomeningocele rota ao nascimento; D) deformidades congênicas dos membros inferiores.....46
- Figura 4 - Técnica cirúrgica convencional para o fechamento das mielomeningoceles no período neonatal. Esquerda) dissecação da dura-máter, direita) sutura do retalho de dura-máter.....48
- Figura 5 - Deiscência de ferida operatória pós fechamento neonatal de mielomeningocele lombossacra.....49
- Figura 6 – Técnica a céu aberto para o fechamento antenatal das mielomeningoceles. Em: A) útero exposto; B) exposição do dorso fetal através da uterotomia; C) fechamento cirúrgico plano a plano; D) aspecto ao nascimento (ND- nova derme, SM - lâmina de silicone destacada e usada junto ao defeito).....51
- Figura 7 - Técnica de tratamento endoscópico para correção intrauterina de mielomeningoceles. Em A) defeito com placódio exposto, em “P”; B, C e D) dissecação endoscópica do placódio e introdução da membrana de nanocelulose bacteriana; E e F) sutura da pele.....53
- Figura 8 – Útero, feto e membranas amnióticas.....57
- Figura 9 – Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV demonstrando o aspecto das faces compacta (A), rugosa (B) e secção transversal (C) das membranas de nanocelulose bacteriana.....60

Figura 10 - Análise de microscopia óptica demonstrando as relações entre as cicatrizações durais e a medula espinhal adjacente. A) e B): aspecto da interface entre a matriz dérmica acelular humana e medula espinhal (flechas pretas), demonstrando aderência do enxerto ao tecido medular e C): aspecto da interface entre a celulose bacteriana (cruz) e a medula espinhal (as flechas curtas demonstram a posição da dura-máter, a flecha longa a “neodura”, a flecha azul a dura original). Não há evidências de aderência entre a medula e a neo dura-máter em C).....61

Figura 11 - Exposição do útero gravídico no momento da cesárea e após acesso endoscópico para tratamento antenatal de mielomeningocele. Nota-se as áreas de cicatrização uterina no momento da cesárea 6 semanas após a correção do defeito.....62

Figura 12 - Diagrama de blocos demonstrando as 3 etapas do trabalho e os experimentos realizados.....67

Figura 13 - Exemplos dos compósitos poliméricas de BNC-PLLA/TMC. Em: A) compósito em dupla camada; B) compósito tricamada com BNC liofilizada por aposição; C) compósito tricamada de PLLA/TMC por imersão; D) exemplo de compósito tricamada por aposição empregando uma membrana de BNC hidratada.....68

Figura 14 - Sistemas teste de permeabilidade à água para as membranas de BNC puras e compósitos poliméricos de BNC-PLLA/TMC. Em A) Detalhe da interposição do biomaterial entre os 2 frascos superior e inferior de cada sistema teste; B) Arranjo de 4 unidades dos sistemas teste, BNC pura (posições 1 e 2), e compósito de BNC-PLLA/TMC (posições 3 e 4).....71

Figura 15 - Diagrama demonstrando o arranjo placa-biomaterial-células para ensaios in vitro de adesão e proliferação de queratinócitos humanos em compósitos de BNC-PLLA/TMC.....78

Figura 16 - Diagrama representando os grupos e ensaios necessários para a caracterização in vitro da atividade metabólica celular e adesão celular de queratinócitos (HaCaT) humanos.....79

Figura 17 – Compósito polimérico de BNC-PLLA/TMC. Em: A) aspecto macroscópico com visão de superfície (tamanho A); B) aspecto

macroscópico com visão de superfície (tamanho B); C) visão da secção transversal à MEV.....	84
Figura 18 - Percentagem de água transposta do frasco superior ao frasco inferior através de membranas de BNC e compósitos de BNC-PLLA/TMC.....	85
Figura 19 - Massas molares ponderadas (M_w) e índice de dispersão (M_w/M_n) dos compósitos de BNC-PLLA/TMC expostos ao PBS durante 90 dias.....	86
Figura 20 - Aspecto à Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies dos compósitos de BNC-PLLA/TMC expostos à solução de PBS/azida 0,02%. Aumento de 500x. Em: A) tempo zero; B) 7 dias; C) 14 dias; D) 30 dias; E) 60 dias; F) 90 dias de exposição.....	88
Figura 21 – Aspecto à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das secções transversais dos compósitos de BNC-PLLA/TMC expostos à solução de PBS/azida 0,02%. Aumento de 500x. Em: A) tempo zero; B) 7 dias; C) 14 dias; D) 30 dias; E) 60 dias; F) 90 dias.....	88
Figura 22 – Micrografias por MEV dos compósitos modificados. Em: A) secção transversal com camada superior modificada, aumento de 900X; B) a visão de superfície com transição entre o centro (superfície modificada) e a periferia mais regular, aumento de 100X; C) detalhe de camada de PLLA/TMC afilada com exposição parcial da BNC, aumento de 3000x; D) visão aproximada da superfície da BNC com fibras entremeadas pelo PLLA/TMC, aumento de 6000X.....	90
Figura 23 – Estrutura química da blenda de PLLA/TMC.....	91
Figura 24 - Análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) de amostras de BNC e compósitos poliméricos de BNC-PLLA/TMC originais e expostos ao PBS por 30, 60 e 90 dias.....	92
Figura 25 – Curvas termogravimétricas (TGA e DTGA) representando as variações das massas de membranas de BNC, de blendas de PLLA/TMC e dos compósitos de BNC-PLLA/TMC expostos ao PBS por 30, 60 e 90 dias em função de temperaturas crescentes.....	93

Figura 26 – Performance mecânica de amostras secas e úmidas de BNC, PLLA/TMC e compósitos de BNC-PLLA/TMC. BNCW, PLLAW, CPW indicam membranas de BNC, PLLA/TMC e compósitos de BNC-PLLA/TMC úmidas, respectivamente. Símbolos iguais denotam performances sem diferença estatística para $p < 0,05$96

Figura 27 – Aspecto de rugosidade de superfície de amostras de BNC, PLLA/TMC, compósitos de BNC-PLLA/TMC originais e compósitos de BNC-PLLA/TMC modificados.....99

Figura 28 - Rugosidade média da superfície de amostras de BNC, PLLA/TMC, compósitos de BNC-PLLA/TMC originais e compósitos de BNC-PLLA/TMC modificados.....99

Figura 29 – Fotografias obtidas durante os testes ângulo de contato. Em: A) membrana de BNC; B) blenda de PLLA/TMC; C) compósito de BNC-PLLA/TMC; D) compósito de BNC-PLLA/TMC modificado..101

Figura 30 – Representação gráfica dos valores de ângulo de contato mensurados a partir da superfície de membranas de BNC, blendas de PLLA/TMC, compósitos de BNC-PLLA/TMC e compósitos de BNC-PLLA/TMC modificados. Símbolos iguais representam medidas estatisticamente iguais para $p < 0,05$102

Figura 31 – Ganhos de massa das membranas de BNC, blendas de PLLA/TMC, compósitos de BNC-PLLA/TMC originais e compósitos modificados.....104

Figura 32 - Atividade metabólica de fibroblastos L929 cultivados em contato direto com as amostras de BNC, PLLA/TMC e BNC-PLLA/TMC. A) BNC-PLLA/TMC versus BNC; B) BNC-PLLA/TMC versus PLLA/TMC) e C) BNC-PLLA/TMC versus placa de cultura..106

Figura 33 – Concentração de dsDNA em células HaCaT, estimada pela técnica do Pico Green®, cultivadas sobre BNC, PLLA/TMC, compósitos de BNC-PLLA/TMC e compósitos modificados de BNC-PLLA/TMC após 1, 7 e 14 dias de cultura. As letras iguais sobre as barras indicam concentrações semelhantes de cada material ao longo dos dias e os símbolos iguais representam semelhança entre os grupos quando comparados entre si para cada dia de cultura em separado (p

<0,05). Letras iguais indicam concentrações semelhantes entre os mesmos biomateriais ao longo dos dias BNC (A e B), PLLA/TMC (C e D), BNC-PLLA/TMC (E e F) e BNC- PLLA/TMC modificados (G e H). Símbolos iguais indicam concentrações semelhantes entre os diferentes materiais a cada dia de análise em separado.....109

Figura 34 – Micrografias obtidas pela técnica confocal de queratinócitos humanos (HaCaT) cultivados sobre os 4 biomateriais por 1, 7 e 14 dias. Membranas de nanocelulose bacteriana (A, E e I), blendas de PLLA/TMC (B, F e J), compósitos de BNC-PLLA/TMC (C, G e K) e compósitos de BNC-PLLA/TMC modificados (D, H e L). Micrografias obtidas pela técnica confocal com aumento de 200X, após aplicação dos corantes DAPI e Faloidina. Barras representativas de 50 µm.....110

Figura 35 – Micrografias obtidas por técnica confocal delineando o padrão de adesão celular nos compósitos modificados nas suas porções centrais e periféricas. Em: A) aspecto da distribuição dos agrupamentos celulares ao centro dos compósitos modificados; B) transição entre o padrão de adesão insular (metade esquerda da figura) e adesão formando uma camada mais ampla de células aderidas (metade direita da figura); C) área de alta densidade celular formando uma camada compacta de queratinócitos aderidos. Aumentos de 200X, coloração com Faloidina (vermelho) e DAPI (azul), as barras horizontais representam 50 µm.....112

Figura 36 – Micrografias obtidas pela técnica confocal de queratinócitos humanos (HaCaT) cultivados sobre os 4 biomateriais por 1, 7 e 14 dias. Membranas de nanocelulose bacteriana (figuras A, E e I), blendas de PLLA/TMC (figuras B, F e J), compósitos de BNC-PLLA/TMC (figuras C, G e K) e compósitos de BNC-PLLA/TMC modificados (figuras D, H e L). Micrografias obtidas pela técnica confocal com aumento de 1000X, após aplicação dos corantes DAPI e Faloidina. Barras representativas de 10 µm.....113

Figura 37 – Padrão de adesão de células HaCaT e correlação topográfica em compósitos de BNC-PLLA/TMC modificados após 14 dias de cultura. Em: A) Micrografia por MEV, com aumento de 25X demonstrando aspecto de superfície do compósito modificado. Círculo pontilhado indicando posição da micrografia B; B) Micrografia por MEV, com aumento de 100X, demonstrando detalhe de irregularidade

topográfica em região de compósito modificado. O círculo pontilhado demonstra posição do aumento na micrografia C; C) Micrografia por MEV, com aumento de 500X, evidenciando queratinócitos aderidos junto à irregularidade topográfica; D) Micrografia por técnica confocal, aumento de 200X e pós coloração com DAPI/Faloidina, demonstrando arranjo celular alongado junto às irregularidades do relevo do compósito; E) Micrografia por MEV, aumento de 1000X, demonstrando queratinócitos aderidos e com morfologia espaiada. Em F): Repetição da micrografia vista na Figura 36L, obtida por técnica confocal, aumento de 1000X e pós coloração com DAPI/Faloidina, demonstrando células HaCaT com abundante citoplasma espaiado.....115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios de indicação e contraindicação para a inclusão no estudo MOMS.	50
Tabela 2 - Comparação entre a cicatrização da pele em fetos e em adultos.....	56
Tabela 3 - Subtipos de compósitos expostos ao PBS e azida 0,02 % por 40 dias.....	68
Tabela 4 - Dimensões e massas dos compósitos de BNC-PLLA/TMC produzidos nos tamanhos A e B.....	83
Tabela 5 – Medidas dos ângulos de contato de amostras de BNC, PLLA/TMC, CP e CPMOD. Símbolos iguais representam materiais com ângulo de contato iguais estatisticamente para $p < 0,05$	102

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

ANOVA	Análise de variância
BNC	Nanocelulose bacteriana, do inglês <i>bacterial nanocellulose</i>
BNC- PLLA/TMC	Compósito polimérico de nanocelulose bacteriana e blenda de poli(L-ácido lático-co-trimetileno carbonato)
CP	Compósito de nanocelulose bacteriana e PLLA/TMC
CPMOD	Compósito de nanocelulose bacteriana e PLLA/TMC modificados na superfície superior
DAPI	Sal dihidroclorídrico, 4', 6-diamino-2-fenilindol
DFTN	Defeitos de fechamento do tubo neural
DMEM	Meio de cultura Dulbecco, do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DP	Desvio padrão
DTGA	Derivada das curvas termogravimétricas
EDS	Espectroscopia por Dispersão de Rx, do inglês <i>Energy dispersive X-ray spectroscopy</i>
EUA	Estados Unidos da América
FTIR	Espectroscopia por Transformada de Fourier
GPC	Cromatografia por Permeação em Gel, do inglês <i>Gel Permeation Chromatography</i>
HaCaT	Queratinócitos humanos provenientes de linhagens imortalizadas
HMDS	Hexametildissilazano
LCME	Laboratório Central de microscopia eletrônica da UFSC
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MOMS	Estudo do manejo das mielomeningoceles, do inglês <i>Management of Myelomeningocele Study</i>
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
M _n	Média numérica das massas molares

M _w	Média ponderal das massas molares
ND	Nova derme
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Placa de cultura
PCL	Poli(ε-caprolactona), do inglês <i>poly(ε-caprolactone)</i>
PDLLA	Poli(D,L-ácido lático), do inglês <i>poly(D-L-lactic acid)</i>
PDLLA/TMC	Poli(D,L-ácido lático-co-trimetileno carbonato), do inglês <i>poly(D,L-lactic acid-co-trimethylene carbonate)</i>
PGA	Poli(ácido glicólico), do inglês <i>polyglycolic acid</i>
PLA	Poli(ácido lático), do inglês <i>polylactic acid</i>
PLA/TMC	Poli(ácido lático-co-trimetileno carbonato), do inglês <i>poly(lactic acid-co-trimethylene carbonate)</i>
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico), do inglês <i>poly(lactic-co-glycolic acid)</i>
PLDLA	Poli(L-co-D,L-ácido lático), do inglês <i>poly(L-co-D,L-lactic acid)</i>
PLLA	Poli(L-ácido lático), do inglês <i>poly(L-lactic acid)</i>
PLLA/PTMC	Poli(L-ácido lático-co-poli-trimetileno carbonato), do inglês <i>poly(L-lactic acid-co-poly-trimethylene carbonate)</i>
PLLA/TMC	Poli(L-ácido lático-co-trimetileno carbonato), do inglês <i>poly(L-lactic acid-co-trimethylene carbonate)</i>
PLLA/TMC/GA	Poli(L-ácido lático-co-trimetileno carbonato-co-ácido glicólico), do inglês <i>poly(L-lactic acid-co-trimethylene carbonate-co-glycolic acid)</i>
PMS	Metossulfato de fenazina
PPDO	Poli(p-dioxanona), do inglês <i>poly(p-dioxanone)</i>
PTFE	Politetrafluoretileno
PTMC	Poli(trimetileno carbonato), do inglês <i>poly(trimethylene carbonate)</i>

P(TMC-CL)	Poli(trimetileno carbonato-co-ε-caprolactona) do inglês <i>poly(trimethylene carbonate-co-ε-caprolactone)</i>
SFB	Soro fetal bovino
SM	Lâmina de silicone
T _d	Temperatura de degradação
TGA	Análise termogravimétrica
THF	Tetrahidrofurano
TMC	Trimetileno carbonato
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

GLOSSÁRIO

Aderência: formação cicatricial, fibrótica, entre diferentes tecidos biológicos, podendo causar disfunção local e a distância quando em contato com o tecido medular espinhal.

Biomateriais: materiais de variadas composições físico-químicas que se destinam a aplicação, temporária ou definitiva, junto a tecidos biológicos sem ensejar reações tóxicas teciduais locais ou sistêmicas.

Cariótipo: estudo microscópico que determina a quantidade e morfologia dos 23 pares de cromossomos das células humanas.

Compósito: combinação de 2 ou mais materiais de características físico-químicas distintas que, ao serem combinados, se comportam de maneira diversa das matrizes originais.

Envoltórios do sistema nervoso central (SNC): são as 3 membranas (pia-máter, aracnóide e dura-máter) que envolvem o SNC em toda a sua extensão craniana e vertebral.

Fístula líquórica: indica a passagem de líquido do compartimento subaracnoideo, através da dura-máter, para o espaço subcutâneo e, eventualmente, através da pele. Esta comunicação anormal aumenta a possibilidade de ocorrência de infecção do sistema nervoso central.

Hidrocefalia: acúmulo de líquido nos ventrículos cerebrais e espaço subaracnoideo, decorrente de desequilíbrio entre a sua produção e absorção.

Malformação de Chiari II: Posição anormal, inferior, das tonsilas cerebelares que se insinuam através do forame magno, podendo causar compressão local e distúrbios da dinâmica líquórica nos pacientes portadores de mielomeningocele.

Mielomeningocele: tipo mais comum de defeito do tubo neural, caracterizado por malformação da medula espinhal, das meninges, da coluna vertebral, da musculatura e pele da região dorsal.

Placódio: Fragmento displásico da medula espinhal residual junto ao defeito cutâneo presente nos disrafismos espinhais.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	37
1.1.1.	OBJETIVO GERAL	41
1.1.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
1.2.	ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO.....	42
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	43
2.1.	DEFEITOS DO TUBO NEURAL	43
2.1.1.	TRATAMENTO	47
2.1.2.	OPORTUNIDADES DE TÉCNICAS DE ENGENHARIA DE TECIDOS PARA O TRATAMENTO ANTENATAL DAS MIELOMENINGOCELES.....	54
2.1.3.	BIOMATERIAIS PARA O FECHAMENTO DE MIELOMENINGOCELES NO PERÍODO ANTENATAL.....	58
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
3.1.	DESENVOLVIMENTOS DOS COMPÓSITOS POLIMÉRICOS DE BNC-PLLA/TMC.....	67
3.1.1.	DEFINIÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS COMPÓSITOS DE BNC-PLLA/TMC.....	67
3.1.2.	PRODUÇÃO DOS COMPÓSITOS DE BNC-PLLA/TMC.....	69
3.2.	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPÓSITOS POLIMÉRICOS DE BNC-PLLA/TMC.....	70
3.2.1.	TESTE DE PERMEABILIDADE À ÁGUA.....	70
3.2.2.	ENSAIO DE DEGRADAÇÃO DOS COMPÓSITOS POLIMÉRICOS DE BNC-PLLA/TMC.....	72
3.2.3.	ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER ..	73
3.2.4.	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA.....	74
3.2.5.	PROPRIEDADES MECÂNICAS	74
3.2.6.	PERFILOMETRIA	75
3.2.7.	MOLHABILIDADE DE SUPERFÍCIE	75
3.2.8.	CAPACIDADE DE HIDRATAÇÃO	75
3.3.	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	76

3.3.1.	ATIVIDADE METABÓLICA DE FIBROBLASTOS L929 EM CONTATO DIRETO COM COMPÓSITOS DE BNC-PLLA/TMC – QUANTIFICAÇÃO PELO MTS.....	76
3.3.2.	ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCaT).....	77
3.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	81
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.1.	PRODUÇÃO DOS COMPÓSITOS DE BNC-PLLA/TMC... ..	83
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DAS BLENDA DE BNC-PLLA/TMC.....	85
4.2.1.	PERMEABILIDADE À ÁGUA.....	85
4.2.2.	ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DOS COMPÓSITOS DE BNC-PLLA/TMC	86
4.2.3.	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER	91
4.2.4.	TERMOGRAVIMETRIA.....	93
4.2.5.	PROPRIEDADES MECÂNICAS	95
4.2.6.	PERFILOMETRIA	98
4.2.7.	MOLHABILIDADE DE SUPERFÍCIE.....	101
4.2.8.	CAPACIDADE DE HIDRATAÇÃO	104
4.3.	ENSAIOS IN VITRO	105
4.3.1.	ATIVIDADE METABÓLICA DE FIBROBLASTOS L929 EM CONTATO DIRETO COM COMPÓSITOS DE BNC-PLLA/TMC – QUANTIFICAÇÃO PELO MTS.....	105
4.3.2.	ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCat).....	108
5.	CONCLUSÕES.....	121
6.	TRABALHOS FUTUROS.....	123
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

1. INTRODUÇÃO

Os defeitos do tubo neural se caracterizam pelo fechamento incompleto de um determinado segmento da medula espinhal ou encéfalo. Estas malformações têm origem ao redor da 4ª semana de gestação, tendo como fatores predisponentes a deficiência de ácido fólico (ou metabolismo anormal dos folatos), o uso de anticonvulsivantes (ácido valpróico) e histórico de períodos de guerras e privações (COPP et al., 2015). A incidência destes defeitos congênitos no Brasil é ao redor de 1/1000 nascidos vivos, enquanto que nos Estados Unidos os novos casos alcançam 1 neonato em 2000 nascimentos (BIZZI; MACHADO, 2012)

Os pacientes acometidos, via de regra, apresentam sérios efeitos sobre a função neurológica de vários segmentos medulares, incorrendo em paralisias, problemas esfinterianos e deformidades ortopédicas. Em aproximadamente 80% dos casos há hidrocefalia, o que pode ocasionar marcados déficits cognitivos. O diagnóstico radiológico é obtido através da ultrassonografia obstétrica morfológica, complementada, quando indicado, pela ressonância magnética fetal. No entanto, o diagnóstico definitivo se dá por fetoscopia ou pelo exame clínico ao nascimento (BEVILACQUA; PEDREIRA 2015).

O tratamento convencional dos defeitos abertos do tubo neural consiste na cirurgia de fechamento da malformação logo após o nascimento, seguido do manejo das complicações secundárias (hidrocefalia, disfunções vesicais, anais e ortopédicas). Apesar do tratamento, o prognóstico funcional na maioria dos casos é ainda bastante reservado, com poucas crianças atingindo marcha independente, e raramente tendo controle vesical normal (BIZZI; MACHADO, 2012; MITCHELL et al., 2004).

Recentes publicações estabelecem o papel da cirurgia antenatal como evidente fator modificador da evolução destes pacientes, diminuindo a ocorrência de malformação de Chiari II e hidrocefalia, bem como possibilitando alguma melhora da performance motora dos membros inferiores (BEVILACQUA; PEDREIRA, 2015; KOHL et al., 2009; ADZICK et al., 2011). A cirurgia antenatal é realizada entre a 22ª e 26ª semana de gestação, tendo como objetivo a oclusão do defeito dorsal. O fechamento do disrafismo nesta fase diminui a exposição do tecido neuronal à toxicidade do líquido amniótico e minimiza os efeitos mecânicos causados ao neuroeixo (forças de tração caudal), o que parece ser responsável pelos melhores resultados quando em

comparação à cirurgia pós-natal (HEFFEZ et al., 1993; ADZICK et al., 2011).

A técnica cirúrgica mais frequentemente empregada para o tratamento intrauterino é realizada a céu aberto, sendo que, mais recentemente, técnicas endoscópicas têm sido utilizadas com o intuito de diminuir os riscos para a mãe e o feto (ADZICK, 2013a; BEVILACQUA; PEDREIRA, 2015; GRAF et al., 2016; MEULI et al., 2013). As técnicas endoscópicas se baseiam em uma menor abertura uterina, utilizando técnicas cirúrgicas de fechamento da malformação fetal menos laboriosas, porém com a necessidade do uso de biomateriais. Como exemplos destes materiais cita-se o uso de matriz decelularizada derivada de colágeno suíno (BADYLAK; FREYTES; GILBERT, 2009), matriz decelularizada derivada de pele humana (HILL; ELWOOD; LIN, 2012), politetrafluoroetileno (PTFE)(MATSUMOTO et al., 2013), blenda de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e colágeno (BAI et al., 2013) e a associação de nanocelulose de origem bacteriana mais colágeno derivado de tendão bovino + glicosaminaglicana (PEDREIRA et al., 2016). A celulose bacteriana pode ser usada isoladamente, mas, nos casos onde os defeitos são extensos e a sutura primária da pele não é possível, é necessário a adição de uma camada externa que seja impermeável a água. No entanto, o uso destes materiais impermeáveis como camada de proteção externa junto aos defeitos (politetrafluoroetileno, polisiloxano) apresenta o inconveniente de incorporar materiais inertes, que não se integram e tendem a se descolar dos tecidos adjacentes (PEDREIRA et al., 2016).

A engenharia de tecidos se constitui em oportunidade única para a desenvolvimento de soluções para o tratamento cirúrgico dos disrafismos espinhais e encefálicos. Os materiais ideais devem ser biocompatíveis e promover a cicatrização da dura-máter, partes moles e pele adjacentes ao defeito. Ainda, o material desenvolvido deve evitar aderência ao tecido medular espinhal e, ao mesmo tempo, deve proporcionar impermeabilidade à água e solutos até que se tenha uma camada epidérmica cicatricial formada.

A nanocelulose bacteriana (BNC, do inglês *Bacterial nanocellulose*) foi utilizada com sucesso como substituto dural em trabalhos experimentais (MELLO et al., 1997; PEDREIRA et al., 2011; SANCHEZ E OLIVEIRA et al., 2007) e clínicos (BEVILACQUA; PEDREIRA, 2015), mas é permeável à água. Polímeros biodegradáveis como o poli(D,L-ácido láctico) (PDLA), o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), o poli(L-ácido) (PLLA) e o trimetileno carbonato

(TMC), têm sido utilizados em diversas aplicações biomédicas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e hidrofobicidade (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005; GUO et al., 2011; SAADAI et al., 2011; WANG, 2013). Neste sentido, este trabalho objetiva desenvolver e testar o conceito de um compósito polimérico de nanocelulose de origem bacteriana associado a uma blenda de PLLA/TMC, com potencial para o tratamento cirúrgico intrauterino das mielomeningoceles.

1.1 OBJETIVO GERAL

1.1.1 Objetivo Geral

Produzir, caracterizar e avaliar um compósito polimérico de nanocelulose bacteriana e blenda de poli(L-ácido lático-co-trimetileno carbonato) (BNC-PLLA/TMC) com potencial para aplicação no tratamento intrauterino dos disrafismos espinhais.

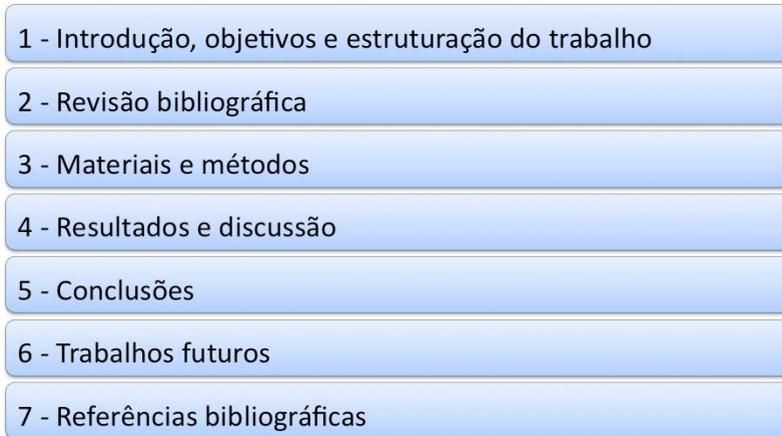
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Produção de um compósito polimérico de BNC-PLLA/TMC através da técnica de imersão e evaporação do solvente (*dip coating*) com potencial para o tratamento dos disrafismos.
- (ii) Caracterização dos compósitos poliméricos de BNC-PLLA/TMC segundo as mais relevantes propriedades físico-químicas para a aplicação em questão:
 - a) permeabilidade à água;
 - b) cinética de degradação;
 - c) interação entre os componentes químicos por espectroscopia no infravermelho;
 - d) estudos termogravimétricos;
 - e) performance mecânica;
 - f) topografia de superfície;
 - g) grau de molhabilidade de superfície;
 - h) capacidade de hidratação.
- (iii) Realização de estudos *in vitro* utilizando os compósitos poliméricos de BNC-PLLA/TMC e suas matrizes poliméricas de BNC e PLLA/TMC:
 - a) determinar a ocorrência, ou não, de citotoxicidade induzida pelos compósitos e polímeros quando em contato com fibroblastos de camundongos L929;
 - b) estudar a adesão e a proliferação de queratinócitos humanos (HaCaT) sobre os compósitos.

1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

O presente trabalho está estruturado em 7 capítulos, como demonstrado na Figura 1.

Figura 1–Estruturação do trabalho.



Fonte: Elaborado pelo autor.

No capítulo introdutório contextualiza-se, de maneira sucinta, o problema em questão e justifica-se a busca por um novo biomaterial com potencial para aplicação na correção dos disrfismos espinhais. Ainda, nesta seção, estão listados os objetivos (geral e específicos) referentes à presente tese.

O segundo capítulo contém uma revisão bibliográfica que apresenta os trabalhos mais relevantes aos assuntos da tese, subdividido em subcapítulos para melhor didática.

No terceiro capítulo, de natureza metodológica, estão delineados os métodos utilizados.

Em seguida, o capítulo intitulado “Resultados e discussão” traz os resultados obtidos, bem como discute tais dados no contexto dos objetivos da presente tese e perante a literatura pertinente.

A seção “Conclusões” lista elementos que procuram atender aos objetivos propostos, enquanto que na seção “Trabalhos futuros”, faz-se menção a oportunidades de futuras investigações relacionadas a esta linha de pesquisa.

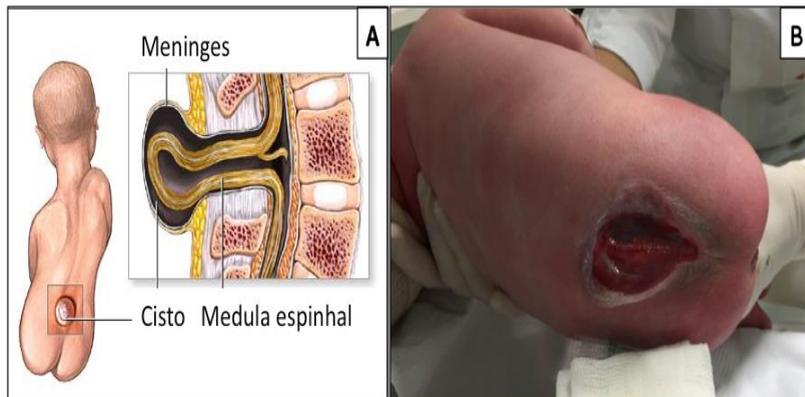
As referências bibliográficas estão listadas no sétimo capítulo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DEFEITOS DO TUBO NEURAL

Os defeitos de fechamento do tubo neural (DFTN) se constituem em sérias malformações que acometem o cérebro, a medula espinhal e seus envoltórios. A incidência varia nas diversas populações segundo suas condições sócio econômicas e também com a época das análises (BIZZI; MACHADO, 2012; COPP; GREENE, 2014; COPP et al., 2015; ZAGANJOR et al., 2016). Nos Estados Unidos da América e no Brasil ocorrem 0,5 e 1,14 novos casos por 1000 nascimentos vivos, respectivamente (BIZZI; MACHADO, 2012), enquanto que estimativas recentes apontam para incidências variando de 0,69 a 2,19 por 1000 nascimentos vivos no Pacífico oeste e leste Mediterrâneo, respectivamente (ZAGANJOR et al., 2016). Os DFTN incluem várias apresentações morfológicas distintas, incluindo as mielomeningoceles, encefalocelos, espinhas bífidas ocultas e anencefalias (COPP; GREENE, 2014; MITCHELL et al., 2004). As mielomeningoceles, também denominadas espinhas bífidas abertas, são os casos mais frequentes, onde a falha de fechamento do tubo neural compromete a medula espinhal, as meninges e partes moles adjacentes aos defeitos, o que, em última instância, expõe o tecido medular ao líquido amniótico circunjacente (Figura 2).

Figura 2 - Aspectos anatômicos dos disrafismos abertos. Em: A) representação gráfica do aspecto dorsal (esquerda) e sagital (direita) da medula espinal exposta através do defeito cutâneo; B) fotografia do aspecto dorsal de mielomeningocele rota ao nascimento.



Fonte: A) <http://www.adamimages.com/Illustration/SearchResult/1/spina%20bifida> acesso em 20/09/2015) e B) arquivo pessoal do autor.

Estas malformações derivam de falhas nos mecanismos responsáveis pela neurulação primária, fase do desenvolvimento embrionário do sistema nervoso que se encerra com o fechamento do tubo neural ao redor do 25º dia gestacional (MITCHELL et al., 2004). A neurulação primária envolve uma complexa cascata de eventos que culmina com o fechamento do tubo neural a partir do dobramento das pregas neurais (COPP; GREENE, 2014). Uma disfunção neste intrincado processo leva à persistência da exposição do tecido neural ao líquido amniótico, impedindo a formação das meninges, vértebras, partes moles e pele na região acometida. A medula espinal, além da displasia tecidual inerente ao disrafismo, está também sujeita a traumatismos, trações, compressões e toxicidade do líquido amniótico hipoosmolar e alguns de seus constituintes, como ureia e creatinina (HEFFFEZ et al., 1993).

As causas que levam ao aparecimento dos DFTN nos seres humanos decorrem de múltiplos fatores, genéticos e ambientais que, infelizmente, são parcamente conhecidos (COPP; GREENE, 2014; MITCHELL et al., 2004). Dentre inúmeros outros fatores imputados na etiopatogenia do aparecimento destas malformações, a história prévia de gravidez com feto portador de DFTN, a carência dietética de ácido

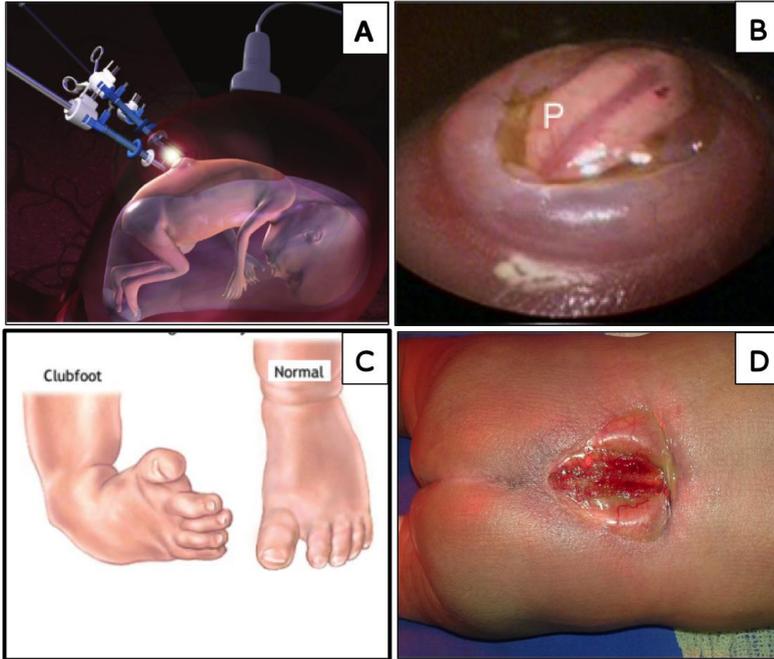
fólico, o diabete gestacional e o uso de ácido valpróico e carbamazepina são fatores reconhecidamente envolvidos com o aumento das chances de acometimento fetal em uma gestação futura (ADZICK, 2013b; MITCHELL et al., 2004). Outros fatores suspeitos incluem: carência materna de vitamina B12, obesidade, hipertermia e diarreia maternas. Do ponto de vista genético, há envolvimento dos genes controladores do metabolismo dos folatos/homocisteína, sendo que os polimorfismos C677T e A1298C da enzima metilenoetetrahidrofolato redutase estão associados com maior risco de desenvolver a malformação (COPP et al., 2015; DE COPPI et al., 2007).

O uso de doses suplementares de ácido fólico, na dose de 500 µg diários por pelo menos 3 meses anteriormente à concepção, e durante toda a gestação, bem como a ingestão de alimentos fortificados, reduz consideravelmente as chances do desenvolvimento de novos casos de DFTN (ADZICK, 2013b; BIZZI; MACHADO, 2012; GREENBERG et al., 2011; MITCHELL et al., 2004).

O diagnóstico dos disrafismos é realizado, na maioria dos casos, através de exames ultrassonográficos de rotina obtidos tipicamente entre a 20^a e 22^a semana de gestação. Esta modalidade diagnóstica tem a capacidade de delinear a malformação espinhal e alguns dos dimorfismos secundários ao defeito original (hidrocefalia, malformação de Arnold Chiari tipo II, deformidades ortopédicas e dilatação vesical) (SANDLER, 2010). A ressonância magnética antenatal é mais raramente empregada, mas possibilita imagens ainda mais nítidas das malformações, tendo indicação mais estrita quando há proposição de manejo antenatal e quando existem dúvidas com relação ao diagnóstico (BIZZI; MACHADO, 2012). A alfa-feto proteína sérica e a dosagem da mesma por amniocentese, também podem ser utilizadas no diagnóstico antenatal, embora, atualmente, o diagnóstico por imagem seja preponderante (BIZZI; MACHADO, 2012; MITCHELL et al., 2004).

Mais importante, o diagnóstico do disrafismo somente é confirmado com a fetoscopia durante o manejo antenatal, ou através da inspeção clínica direta ao nascimento (Figura 3) (BEVILACQUA; PEDREIRA, 2015; MITCHELL et al., 2004).

Figura 3 - Diagnóstico fetoscópico e clínico dos disrafismos abertos. Em: A) esquema demonstrando o acesso endoscópico; B) imagem por fetoscopia demonstrando o defeito espinhal; C) deformidades congênitas dos membros inferiores e D) imagem de mielomeningocele rota ao nascimento.



Fonte: A) extraído de BEVILACQUA; PEDREIRA 2015; B) extraído de BEVILACQUA; PEDREIRA 2015; C) <http://www.adamimages.com/Illustration/SearchResult/1/spina%20bifida> acesso em 20/09/2015 e D) arquivo pessoal do autor.

No momento do parto, o diagnóstico clínico deve esclarecer se o disrafismo é aberto ou fechado, se há ou não macrocrania com possível hidrocefalia e deve também avaliar o estado neurológico, a ocorrência de deformidades em membros inferiores e os distúrbios esfinterianos evidentes.

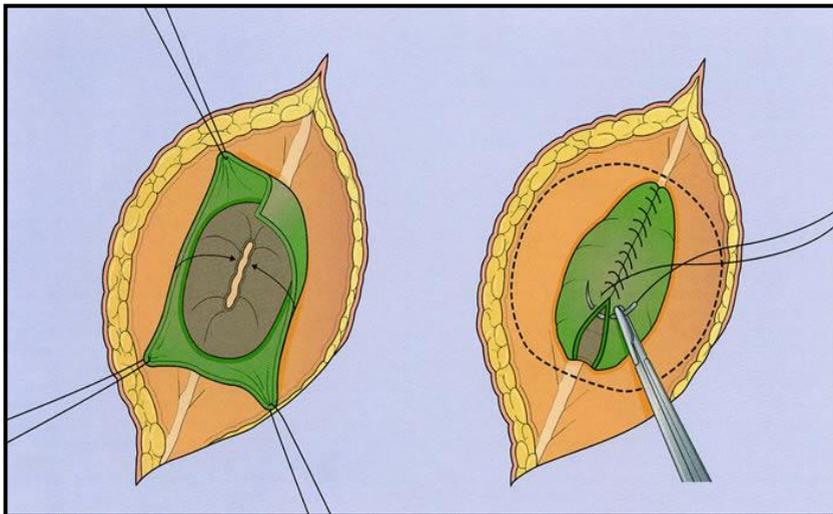
2.1.1 TRATAMENTO

2.1.1.1 TRATAMENTO CONVENCIONAL

O tratamento habitual das mielomeningoceles, ou disrafismos espinhais rotas ao nascimento envolve, primariamente, o fechamento cirúrgico do defeito dorsal e, secundariamente, o tratamento das complicações advindas da malformação, como a hidrocefalia, as deformidades dos membros inferiores e as disfunções esfinterianas (BIZZI; MACHADO, 2012; GREENBERG et al., 2011). A correção cirúrgica na fase aguda pós-natal tem por objetivo minimizar as chances de infecção, e, por este motivo, deve ser realizada o mais precocemente possível, idealmente dentro das primeiras 48 h de vida (MITCHELL et al., 2004).

A técnica pós-natal envolve o fechamento do maior número de planos cirúrgicos possível, limitando a ocorrência de fistula liquórica e infecção do sistema nervoso central (BIZZI; MACHADO, 2012; SANDLER, 2010). A cirurgia se inicia com a dissecação do placódio (fragmento displásico da medula espinhal residual junto ao defeito cutâneo) a partir dos elementos epidérmicos, seguida do fechamento do plano pial, para reconstituição do formato do tubo neural. Em seguida, identifica-se, disseca-se e sutura-se a dura-máter residual. Esta fase é vital para a prevenção de fístula liquórica através da pele no pós-operatório. Após a síntese dural, procede-se com o fechamento do plano fascial, tecido celular subcutâneo e pele (Figura 4).

Figura 4 - Técnica cirúrgica convencional para o fechamento das mielomeningoceles no período neonatal. À esquerda dissecação da dura-máter e à direita sutura do retalho.



Fonte: (Adaptado de <http://www.seattlechildrens.org/medical-conditions/chromosomal-genetic-conditions/myelomeningocele-treatment/>, acesso em 20/03/2016).

Dadas as dimensões de alguns dos defeitos, muitas vezes não é possível o fechamento primário de todos os planos cirúrgicos, sendo então necessário o uso de técnicas de rotação de retalhos para se conseguir a aproximação da fáscia e da pele. Evidentemente, a presença de fistula líquórica no pós-operatório, bem como a ocorrência de fechamento da pele com tensão, favorece o aparecimento de deiscências de ferida cirúrgica (Figura 5).

Figura 5 - Deiscência de ferida operatória pós fechamento neonatal de mielomeningocele lombossacra.



Fonte: arquivo pessoal do autor.

A maioria dos casos de deiscência da ferida operatória nestes pacientes é manejada com curativos que favoreçam a cicatrização por segunda intenção.

2.1.1.2 TRATAMENTO ANTENATAL

Apesar dos progressos recentes no manejo pós-natal agudo das mielomeningoceles rotas e suas complicações, o prognóstico para os pacientes acometidos continua bastante reservado, a curto e longo prazo (ADZICK, 2013b; BIZZI; MACHADO, 2012; HUNT; OAKESHOTT, 2004). Hunt e Oakeshott (2004) demonstraram resultados de um grupo de 117 pacientes submetidos à cirurgia em até 48h de vida. Após 30 anos de seguimento médio, 51% dos pacientes tinham falecido. Dos sobreviventes, 85% receberam uma derivação liquórica, 70% tinham um coeficiente de inteligência (QI) maior que 80 e somente 30% conseguiam deambular sem ajuda. Em face dos resultados do tratamento pós-natal e, em virtude das evidências dos danos secundários advindos

da exposição da medula espinhal ao líquido amniótico durante a maior parte da gestação (HEFFEZ et al., 1993), iniciou-se uma busca por soluções que pudessem oferecer um tratamento antenatal que mitigasse tais agravos. Por conseguinte, nos anos 80, os primeiros experimentos em modelos *in vivo* para o fechamento intrauterino das mielomeningoceles foram publicados com resultados promissores (MICHEJDA; HODGEN, 1985), sendo que os primeiros casos em humanos foram descritos por Bruner e Tulipan em 1998 (TULIPAN; BRUNER, 1998). Em seguida, grupos nos Estados Unidos (ADZICK, 2013b) e na Europa (KOHL et al., 2009) iniciaram seus programas de cirurgia fetal para o tratamento antenatal dos disrafismos, com evidentes benefícios aos fetos, porém também incorrendo em consideráveis índices de prematuridade e complicações maternas (PEDREIRA et al., 2016). Três centros de medicina fetal nos Estados Unidos se organizaram para a condução de um estudo randomizado (MOMS – Estudo do manejo das mielomeningoceles, do inglês *Management of Myelomeningocele Study*) determinado a comparar a evolução de 183 casos, randomizados entre cirurgia tradicional (reparo pós-natal) ou manejados através de cirurgia antenatal (ADZICK et al., 2011). Os critérios de indicação para recrutamento ao estudo estão listados na Tabela1.

Tabela1 - Critérios de indicação e contraíndicação para a inclusão no estudo MOMS.

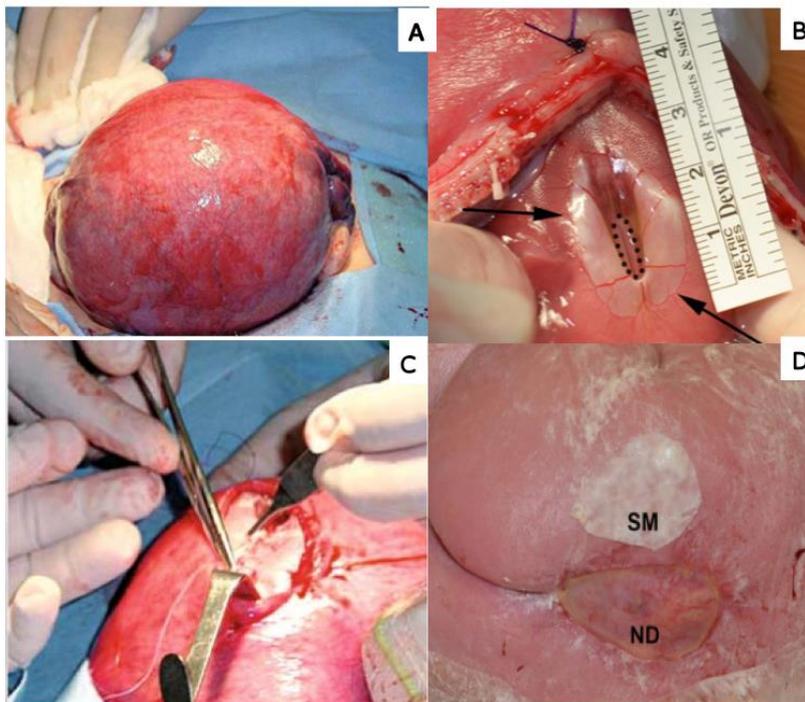
Critérios de indicação	Critérios de contraíndicação
Gestação única	Gestação múltipla
Limite superior do defeito em T1	Múltiplas malformações
Evidência de Chiari II	Placenta prévia
Idade gestacional de 19 sem a 25 sem + 6 dias	Índice de massa corporal > 35
Cariótipo normal	Histerotomia prévia ao longo do segmento ativo uterino
Residência nos EUA	-
Idade materna superior ou igual a 18 anos	-

Fonte: Adaptado de Adzick et al., 2011.

As pacientes que atendiam aos critérios foram randomizadas nos 2 grupos, 92 casos para tratamento pós-natal e 91 casos para o tratamento antenatal. A cirurgia antenatal consiste no acesso

transuterino à cavidade amniótica, posicionamento fetal com exposição da mielomeningocele e correção cirúrgica da mesma, infusão de solução de Ringer lactato e fechamento da parede uterina e abdominal com técnica padrão (Figura 6).

Figura 6 – Técnica a céu aberto para o fechamento antenatal das mielomeningoceles. Em: A) útero exposto; B) exposição do dorso fetal através da uterotomia; C) fechamento cirúrgico plano a plano; D) aspecto ao nascimento (ND- nova derme, SM - lâmina de silicone destacada junto ao de feito).



Fonte: Adaptado de Meuli et al 2013.

Como resultados, observou-se que os casos submetidos ao tratamento antenatal apresentaram menor número de casos com indicação de derivação liquórica para hidrocefalia em comparação aos casos do grupo tratado no período pós-natal (40% e 82%, respectivamente), melhor performance motora (2 níveis motores melhor do que o esperado para o nível medular acometido) e melhor desenvolvimento neuropsicomotor aos 30 meses de vida e menor

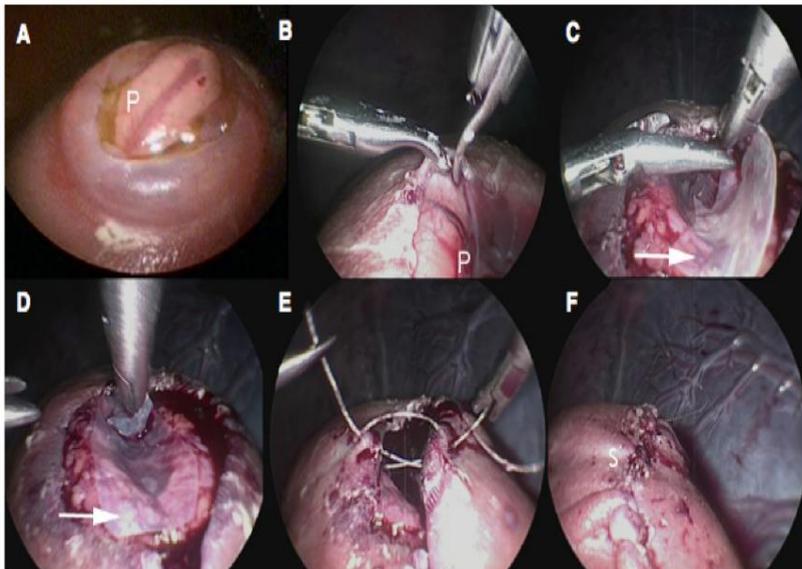
incidência e severidade de malformação de Chiari II. Entretanto, com o tratamento agregou-se maior morbidade materna (edema pulmonar, maior frequência de transfusão sanguínea, oligodramnios, ruptura precoce de membranas, defeitos da cicatrização uterina e possibilidade de deiscência da parede uterina) e maior morbidade fetal (prematuridade e suas complicações). Apesar da maior incidência de complicações, os melhores resultados para o neonato motivaram o comitê de ética responsável pela condução do estudo a interromper o mesmo, em favor da cirurgia antenatal.

2.1.1.3 CIRURGIA ANTENATAL PELA TÉCNICA ENDOSCÓPICA

Embora já estejam muito bem documentados os benefícios da correção antenatal das mielomeningoceles, persiste a preocupação com a considerável morbidade materno/fetal relacionada à cirurgia a céu aberto, o que levou alguns centros de cirurgia fetal ao desenvolvimento de técnicas fetoscópicas para o manejo intrauterino destes casos (ADZICK, 2013a, 2013b; BEVILACQUA; PEDREIRA, 2015; GRAF et al., 2016). As técnicas fetoscópicas se baseiam na premissa de que uma menor manipulação da parede uterina e das membranas adjacentes acarrete em um menor índice de complicações maternas e menor índice de prematuridade (BEVILACQUA; PEDREIRA, 2015). Inicialmente, estudos experimentais realizados pelos mesmos grupos, principalmente em modelos experimentais utilizando ovelhas, demonstram a eficácia do método, em tanto que fechamento dos defeitos e adequada tolerabilidade fetal e materna (KOHL et al., 2003; PEDREIRA et al., 2011). Tecnicamente, a cirurgia utiliza acesso à cavidade amniótica através de 3 a 4 *trocards* empregados para a fetoscopia e passagem do instrumental cirúrgico e material de síntese (

Figura 7). Após identificação e dissecação do placódio neural, os defeitos são cobertos com nanocelulose de origem bacteriana (Bionext[®], Paraná, Brasil), sobrepostos por uma camada de sutura primária da pele com sutura de polipropileno 2-0, ou mesmo, quando o defeito cutâneo era muito extenso, por um substituto cutâneo bicamada à base de colágeno derivado de tendão bovino/glicosaminoglicanas e silicone semipermeável (molde de regeneração dérmica, do inglês *Dermal Regeneration Template*[®]; Integra, EUA)(BEVILACQUA; PEDREIRA, 2015).

Figura 7 - Técnica de tratamento endoscópico para correção intrauterina de mielomeningoceles. Em A) defeito com placódio exposto, em “P”; B, C e D) dissecação endoscópica do placódio e introdução da membrana de nanocelulose bacteriana; E e F) sutura da pele.



Fonte: Adaptado de Pedreira et al, 2015.

Outro autor prefere o uso de uma camada de colágeno derivado de submucosa intestinal de suíno (Durasis[®], Cook, Alemanha) em eventual associação com placa de politetrafluoroetileno (PTFE - Preclude[®], Gore, Alemanha) nos casos onde se espera maior aderência das partes moles ao placódio (GRAF et al., 2016). Como resultados, estes 2 estudos demonstraram a eficácia do método ao diminuir a necessidade de derivações liquóricas, manutenção ou melhora da performance motora esperada para o nível medular das lesões e prevenção das malformações de Chiari II, semelhantemente ao obtido no estudo MOMS (ADZICK et al., 2011). Ainda, do ponto de vista de complicações maternas, houve menor incidência de descolamento prematuro de placenta, oligodramnios, deiscência uterina e edema pulmonar quando em comparação ao estudo MOMS. No entanto, Graf

et al.(2016) observaram que 28% dos neonatos submetidos ao tratamento por cirurgia antenatal endoscópica apresentaram persistência de deiscências e fístulas liquóricas junto às feridas dorsais e necessitaram de procedimentos pós-natais para controle de fistulas e fechamento cutâneo, enquanto que na série descrita por Pedreira et al. (2015), 2 em 8 casos (25%) tiveram tal desfecho.

2.1.2 OPORTUNIDADES DE TÉCNICAS DE ENGENHARIA DE TECIDOS PARA O TRATAMENTO ANTENATAL DAS MIELOMENINGOCELES

A engenharia de tecidos apresenta grande potencial para a elaboração de soluções para a regeneração tecidual em várias situações clínicas, incluindo o fechamento intrauterino dos disrafismos espinhais (WATANABE et al., 2015; WONG et al., 2012). A engenharia tecidual se estabelece como uma área multidisciplinar do conhecimento, que se apoia no tripé: células, arcabouço celular e fatores de crescimento (WONG; GURTNER, 2010; WONG et al., 2012). A demanda por um biomaterial para o fechamento antenatal das mielomeningoceles envolve os seguintes pré-requisitos: biocompatibilidade, integração, impermeabilidade transitória à água e solutos contidos no líquido amniótico e, ao mesmo tempo, que seja capaz de promover a cicatrização da dura-máter, partes moles e pele sobre o defeito espinhal sem aderir à medula espinhal na região (ADZICK, 2013b; AURAND et al., 2012; WANG, 2013). Dois fatores específicos ao processo de cicatrização de feridas no período antenatal são determinantes para a concepção de técnicas e biomateriais que auxiliem neste processo: a cicatrização fetal e a presença do líquido amniótico (BEVILACQUA; PEDREIRA, 2015).

2.1.2.1 CICATRIZAÇÃO DA PELE DURANTE O PERÍODO FETAL

A cicatrização de feridas cutâneas acontece em etapas, terminando com a formação de um tecido fibrótico com características diferentes da cobertura epidérmica original. Este processo está presente nos mamíferos e difere, por exemplo, da capacidade de reparação de alguns répteis, os quais apresentam um predomínio de processos regenerativos em comparação à formação de cicatrizes fibróticas (GURTNER et al., 2008). A pele humana é formada pela epiderme,

derme, tecido subcutâneo e anexos (pelos, glândulas sebáceas e sudoríparas). Após lesão cutânea, iniciam-se os fenômenos relacionados às fases da cicatrização: 1. inflamação; 2. proliferação e 3. remodelamento. Estas 3 fases se superpõem no tempo, sendo que o período cicatricial inflamatório se inicia logo após a lesão, agregando células sanguíneas, incluindo neutrófilos e plaquetas, com o propósito de interromper a solução de continuidade, estancando uma eventual hemorragia e prevenindo a proliferação de bactérias junto ao ferimento. Esta fase dura ao redor de 48h, a partir de quando ocorre uma diminuição progressiva do estado inflamatório e inicia-se a fase proliferativa. Nesta fase ocorre angiogênese, bem como migram e proliferam queratinócitos e fibroblastos que depositam colágeno. Durando em torno de 3 semanas, esta fase se caracteriza pela formação de tecido fibrótico junto à lesão, de características completamente distintas do tecido original, inclusive sem os anexos cutâneos. Este tecido cicatricial entra então, a partir de 4 semanas e com duração de até 1 ano, na fase de remodelamento, quando ocorre a substituição de fibroblastos por miofibroblastos, que desempenham importante papel na contração cicatricial (GURTNER et al., 2008). Com o progresso da fase de remodelamento, há um despovoamento celular da região (as custas dos mecanismos de morte celular programada - apoptose) e a substituição de colágeno tipo III por colágeno tipo I (LOVVORN et al., 1999).

A Tabela 2 apresenta, sumariamente, as diferenças entre a cicatrização humana fetal e em adultos.

Tabela 2 - Comparação entre a cicatrização da pele em fetos e em adultos.

Característica da cicatrização	Adulto	Feto
Cicatriz	Presente	Ausente
Crescimento e diferenciação celular	Ausente	Presente
Velocidade de reparo	Mais lenta	Mais rápida
Formação de crosta	Presente	Ausente
Tensão de oxigênio	Maior	Menor
Inflamação aguda	Maior	Reduzida
Deposição de matriz	Mais lenta	Mais rápida
Angiogênese	Maior	Reduzida
Epitelização	Mais lenta	Mais rápida
Queratinização	Presente	Imatura, formação do periderme
Ambiente	Seco e contaminado	Líquido amniótico, estéril
Matriz extracelular	Menos ácido hialurônico e mais glicosaminoglicanas sulfatadas	Mais ácido hialurônico e mais glicosaminoglicanas não sulfatadas
TGF β	TGF β 1	TGF β 3
Fibronectina	Menos	Mais
Colágeno	Tipo I	Tipo III

Fonte: Adaptado de BULLAR et al 2003.

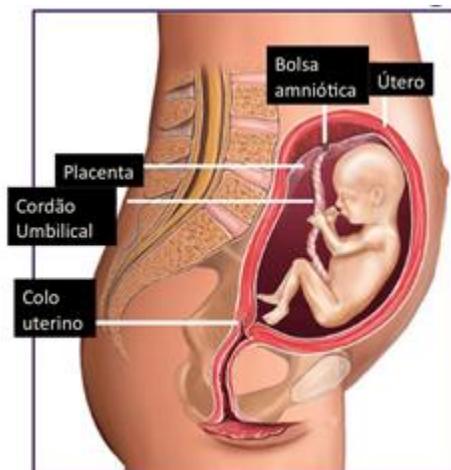
Sobretudo nas fases iniciais da gestação (até 24 semanas), há condições para uma cicatrização mais eficaz, com menor formação de tecido fibrótico e de cicatrizes cutâneas muitas vezes não identificáveis (BULLARD; LONGAKER; LORENZ, 2003). Esta maior eficácia ao reparar tecidos lesados, incluindo a pele, está mais relacionada a fatores fetais do que a fatores relacionados ao ambiente intrauterino. Além do tempo de gestação como fator determinante do potencial de cicatrização fetal, citam-se o tamanho das feridas, o menor envolvimento de polimorfonucleares no início da cascata, maior deposição de ácido hialurônico e predomínio de colágeno tipo III secretados pelos fibroblastos fetais, em comparação com fibroblastos mais maduros que secretam predominantemente colágeno tipo I (LORENZ; ADZICK, 1993). A matriz extracelular dos tecidos reparados varia não somente

com a deposição de colágeno, mas também com o arranjo das fibras, sendo reticular nos fetos e granular nos adultos (BULLARD; LONGAKER; LORENZ, 2003). A epiderme rudimentar inicia sua formação no 20º dia gestacional, evoluindo para formação de uma derme altamente celular e com estratificação da epiderme ao redor da 14ª semana, completando com a sua queratinização ao redor da 24ª semana. A pele fetal queratinizada, a partir deste período gestacional, interrompe as trocas de fluidos entre o feto e o líquido amniótico através da via transcutânea (MAGANN; SANDLIN; OUNPRASEUTH, 2011).

2.1.2.2 O LÍQUIDO AMNIÓTICO

O líquido amniótico se acumula na bolsa amniótica, membrana que envolve o embrião, desde o início da gestação, sendo medido através de análises ultrassonográficas a partir da 14ª semana, alcançando seu volume máximo (1000 mL) ao redor da 34ª semana, para então lentamente diminuir de volume até o termo de 40 semanas (Figura 8).

Figura 8– Útero, feto e membranas amnióticas.



Fonte: Adaptado de <http://www.stanfordchildrens.org/en/topic/default?id=anatomy-fetus-in-utero-85-P01189>, acesso em 31.01.2016.

O líquido amniótico contém água, eletrólitos, proteínas, lipídios, carboidratos e células multipotenciais fetais (DE COPPI et al., 2007; MAGANN; SANDLIN; OUNPRASEUTH, 2011). Tem função de proteção a traumatismos tocofetais, é fonte de água e nutrientes, além de

possibilitar o desenvolvimento sistêmico e pulmonar do feto. Participam na formação do líquido amniótico, a urina fetal, fluidos pulmonares fetais e transporte transmembrana amniótica. O líquido amniótico tem pH entre 7 e 7,5 com osmolaridade ao redor de 250 mOsm/mL, o que o torna hipoosmolar quando em comparação à osmolaridade fetal sérica de 280 mOsm/mL. Este gradiente osmótico é, supostamente, um dos responsáveis pelo agravamento secundário das lesões neurológicas observadas nos casos de disrafismo espinhal (ADZICK, 2013b; HEFFEZ et al., 1993).

2.1.3 BIOMATERIAIS PARA O FECHAMENTO DE MIELOMENINGOCELES NO PERÍODO ANTENATAL

Como mencionado anteriormente, algumas combinações de biomateriais, isolada e conjuntamente, têm sido propostas para a oclusão das mielomeningoceles por via endoscópica, em modelos experimentais (KOHL et al., 2003; PEDREIRA et al., 2011) e clínicos (GRAF et al., 2016; PEDREIRA et al., 2016). As duas opções mais frequentemente utilizadas, materiais derivados de colágeno bovino ou suíno (GRAF et al., 2016; KOHL et al., 2003), e nanocelulose bacteriana (BNC) (PEDREIRA et al., 2011, 2016), tem sido empregadas clinicamente com semelhantes índices de sucesso. Porém, ao se reparar defeitos mais extensos, os autores supracitados relatam a necessidade do uso de membranas inertes à base de silicone ou PTFE, e desta forma acrescentam materiais reconhecidamente inertes às correções (WANG, 2013).

Kohl et al. (2003) publicaram resultados do uso de enxertos heterólogos de PTFE (Preclude[®], Gore, Alemanha) e colágeno derivado de pericárdio bovino (Tutopatch[®], RTI Surgical, EUA) em um modelo experimental de mielomeningocele em ovelhas. Após um período médio de permanência de 40 dias no útero, os fetos foram sacrificados e submetidos à autopsia que demonstrou adequada cobertura dos defeitos dorsais em todos os animais, bem como, foi evidenciado que não havia qualquer aderência ao PTFE. No caso onde foi utilizado o colágeno, os tecidos adjacentes estavam aderidos uma área de fibrose local, enquanto que o enxerto havia sido totalmente absorvido.

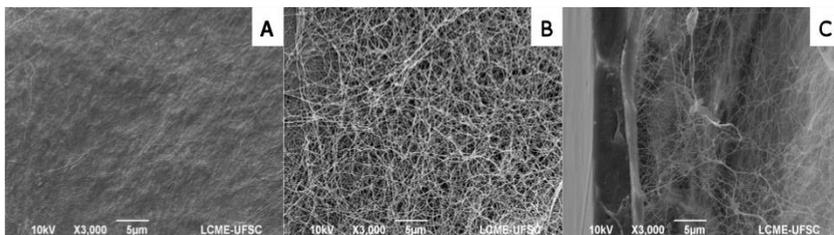
O outro biomaterial de aplicação corrente nas cirurgias intrauterinas endoscópicas de reparo de mielomeningocele, a celulose de origem bacteriana (BNC), está descrito em detalhes a seguir.

2.1.3.1 O USO DA NANOCELULOSE DE ORIGEM BACTERIANA NO TRATAMENTO DAS MIELOMENINGOCELES

A nanocelulose bacteriana (BNC, do inglês *Bacterial nanocellulose*), um polissacarídeo extracelular composto de múltiplas unidades de d-glicose interligadas por junções $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicas, é produzida por várias bactérias Gram negativas, incluindo espécies do gênero *Gluconacetobacter*, como a *G. xylinum* e a *G. hansenii* (ALMEIDA et al., 2014; RECOUVREUX et al., 2008). A celulose gerada se acumula na interface entre o meio de cultura e o ar, podendo ser produzida em películas, pastilhas ou virtualmente qualquer formato a partir da modulação exercida pelos meios de cultura, substratos, geometria dos recipientes e oxigenação (HELENIUS et al., 2006; PETERSEN; GATENHOLM, 2011; RAMBO et al., 2008; RECOUVREUX et al., 2008; STUMPF et al., 2013; SULAEVA et al., 2015). A BNC apresenta 2 faces distintas, dependentes da posição entre o meio de cultura e o ar. A face superior, em contato com o ar, tem arranjo nanofibrilar mais compacto e liso, enquanto que a face inferior, em contato com o meio líquido de cultura, tem aspecto poroso e com menor densidade de fibras (Figura 9). Tipicamente, um meio de cultura adequado para o cultivo do *G. hansenii* ATCC 23769 envolve o uso de manitol, extrato de levedura e peptona, podendo ser adicionadas outras fontes de carbono, como dextrina e glicose (STUMPF et al., 2013). As membranas de nanocelulose de origem bacteriana têm visto crescente aplicação em engenharia biomédica devido às suas propriedades físicas, químicas e biológicas: é hidrofílica, de baixa degradabilidade, alta cristalinidade, biocompatível, porosa, tem alta resistência mecânica, é hipoalergênica e de estrutura arquitetural semelhante à matriz extracelular de colágeno (AURAND et al., 2012; GOLDSCHMIDT et al., 2016; HELENIUS et al., 2006; HU; CATCHMARK, 2011; PETERSEN; GATENHOLM, 2011; SULAEVA et al., 2015). Ainda, a celulose bacteriana é bastante flexível, permitindo a construção de estruturas macro, micro e nanométricas para as mais diversas demandas (PETERSEN; GATENHOLM, 2011). As propriedades mecânicas das membranas de BNC variam conforme as cepas das bactérias produtoras, tempo e condições de cultivo, podendo originar materiais com módulos de elasticidade variando de kilo Pascal (kPa) a giga Pascal (GPa), resistência tênsil de kilo Pascal (kPa) a mega Pascal (MPa) e cristalinidade entre 60-80% (GODINHO et al., 2016; SULAEVA et al.,

2015). Exemplos de uso incluem enxertos de válvulas cardíacas, próteses arteriais e de dura-máter, liberação tópica de drogas, além de tratamento de extensas lesões cutâneas (ALMEIDA et al., 2014; CZAJA et al., 2007; PETERSEN; GATENHOLM, 2011; SANCHEZ E OLIVEIRA et al., 2007).

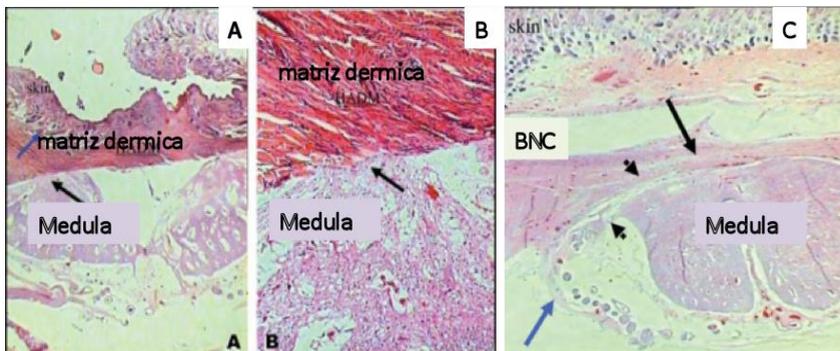
Figura 9 – Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV demonstrando o aspecto das faces compacta (A), rugosa (B) e secção transversal (C) das membranas de nanocelulose bacteriana.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Sanchez e Oliveira et al. (2007) publicaram resultados comparando o uso da nanocelulose de origem bacteriana (Bionext[®], Paraná, Brasil) e a matriz dérmica acelular humana (AlloDerm[®], Lifecell, EUA) em um modelo de mielomeningocele em ovelhas. Após período médio de permanência uterina de 40 dias após a cirurgia, os autores observaram que o grupo submetido à correção com a matriz dérmica acelular humana apresentou análise histológica demonstrando cicatrização sobre os defeitos, porém com marcada aderência entre a fibrose e a medula espinhal adjacente. Em contrapartida, no grupo onde foi utilizada a celulose bacteriana, observou-se a formação de uma camada contígua à dura-máter residual, sem evidências de aderências com a medula espinhal junto aos defeitos (Figura 10). A adequada histocompatibilidade da celulose bacteriana e a consequente ausência de aderência da celulose bacteriana ao tecido neural já havia sido observada em um estudo experimental em cães junto ao córtex encefálico frontal (MELLO et al., 1997).

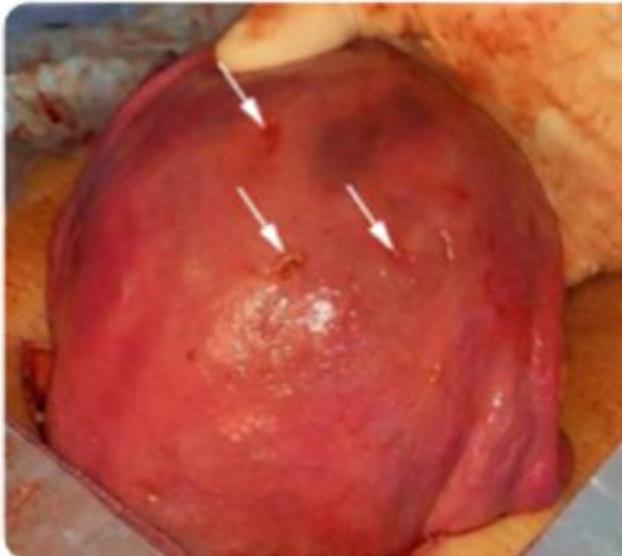
Figura 10 - Análise de microscopia óptica demonstrando as relações entre as cicatrizações durais e a medula espinhal adjacente. A) e B): aspecto da interface entre a matriz dérmica acelular humana e medula espinhal (flechas pretas), demonstrando aderência do enxerto ao tecido medular e C): aspecto da interface entre a celulose bacteriana (cruz) e a medula espinhal (as flechas curtas demonstram a posição da dura-máter, a flecha longa a “neodura”, a flecha azul a dura-máter original). Não há evidências de aderência entre a medula e a neo dura-máter em C).



Fonte: Adaptado de Sanchez e Oliveira et al., 2007.

Em trabalho recente, Pedreira et al. (2015) descreveram uma série inicial de 10 casos de tratamento antenatal de mielomeningoceles lombossacras em fetos humanos tratadas pela técnica endoscópica (PEDREIRA et al., 2015). Nesta série, os autores relatam a experiência com o uso da nanocelulose bacteriana junto à malformação em associação com a sutura primária da pele sobre o enxerto. Ocorreram 1 óbito fetal e 1 óbito neonatal, sendo que em outro caso não foi possível o fechamento intrauterino. Dos 7 fetos restantes, a reversão da malformação de Chiari ocorreu em 6/7 casos, enquanto que a performance funcional motora foi igual ou melhor ao nível medular esperado em 6/7 casos. Três fetos desenvolveram hidrocefalia ativa, necessitando da inserção de derivações. Não se identificou deiscência ou ruptura de parede uterina (Figura 11) no momento da cesariana para a interrupção da gestação.

Figura 11 - Exposição do útero gravídico no momento da cesárea e após acesso endoscópico para tratamento antenatal de mielomeningocele. Nota-se as áreas de cicatrização uterina no momento da cesárea 6 semanas após a correção do defeito.



Fonte: Adaptado de Pedreira et al 2015.

A nanocelulose de origem bacteriana, não obstante sua comprovada biocompatibilidade, maleabilidade e ação facilitadora da cicatrização dural, é permeável à água, o que se constitui em desvantagem, sobretudo nos casos onde não se consegue o fechamento primário da pele. Com o uso da nanocelulose *in natura*, o placódio (tecido da medula espinhal residual junto ao defeito cutâneo) permaneceria exposto à contínua agressão por parte do líquido amniótico hipoosmolar.

De outra maneira, os materiais impermeáveis à água são, na sua grande maioria, inertes (PTFE, polisiloxano), e que, ao não se integrarem aos tecidos adjacentes, favorecem a instalação de infecções, descolamentos, encapsulamentos, deiscências e fistulas liquóricas (GRAF et al., 2016; WANG, 2013). Neste contexto, procurou-se associar à celulose bacteriana um biomaterial que fosse impermeável à água e, ao mesmo tempo, bioabsorvível e integrável ao seu intorno.

2.1.3.2 POLÍMEROS BIODEGRÁDAVEIS COMPATÍVEIS COM O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Desde a introdução dos biopolímeros sintéticos biodegradáveis, nos anos 60, diversas áreas do conhecimento têm pesquisado e utilizado tais biomateriais, incluindo a indústria das embalagens, agricultura e medicina (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005; LI et al., 2014; SAADAI et al., 2011; VROMAN; TIGHZERT, 2009). A capacidade de biodegradabilidade de determinado polímero, seja ele natural ou sintético, depende de fenômenos físicos, químicos e biológicos. Dentre os vários grupos de polímeros de aplicação biomédica, destacam-se os poliésteres, as poliamidas, poliuretanos, os policarbonatos, poliureias e polianidridos (VROMAN e TIGHZERT, 2009). Os poliésteres, especialmente os poliésteres alifáticos, estão entre os biopolímeros sintéticos mais estudados e empregados em processos biomédicos, sobretudo pela capacidade de biodegradabilidade relacionada à hidrólise das ligações de éster (BJUGSTAD et al., 2010; MOCHIZUKI; HIRAMI, 1997). O poli(ácido glicólico) (PGA, do inglês *poly(glicolide acid)*), o poli(ácido láctico) (PLA, do inglês *polylactic acid*) e suas variantes: poli(L-ácido láctico) (PLLA, do inglês *poly(L-lactic acid)*), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA do inglês *poly(lactic-co-glycolic acid)*), poli(p-dioxanona) (PPDO do inglês *poly(p-dioxanone)*) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL, do inglês *poly(ϵ -caprolactone)*) têm visto uso crescente e com excelentes resultados em variadas aplicações biomédicas, incluindo patologias vasculares e cardiológicas (DARGAVILLE et al., 2011; YANG et al., 2010), craniofaciais (GOODRICH; TEPPER; STAFFENBERG, 2012), neurológicas (BARBOLT et al., 2001; SAADAI et al., 2011; BJUGSTAD et al., 2010) e oncológicas (MAKADIA; SIEGEL, 2011). Barbolt et al. (2011), estudaram, comparativamente, 3 biomateriais para o fechamento de defeitos durais junto ao crânio de coelhos em até 180 dias de exposição. Análises histológicas demonstraram que as malhas de poligalactina 910/polidioxanona, em comparação a enxertos derivados de pericárdio bovino e PTFE, apresentaram menor aderência junto ao cérebro, absorção completa do material em 6 meses e consequente baixa atividade inflamatória regional. Em outro trabalho, Saadai et al. (2011), avaliaram o uso de arcabouços de PLLA nanoestruturados por eletrofiação em modelos *in vivo* de mielomeningocele, tendo observado que as membranas não induziram reação de corpo estranho junto aos implantes e na interface material-medula espinhal.

2.1.3.3 COMBINAÇÕES POLIMÉRICAS E MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DOS BIOPOLÍMEROS

Apesar do grande número de biopolímeros disponíveis com potencial para diversas aplicações biomédicas, os materiais tendem a apresentar características físico-químicas parecidas entre si, sendo que para usos bastante específicos, como no caso em questão - tratamento intrauterino de mielomeningoceles, são necessárias modificações dos seus componentes químicos, como a indução de reticulação polimérica (do inglês *crosslinking*) (DARGAVILLE et al., 2011) e a formação de blendas poliméricas de diversas composições de frações molares (DONG et al., 2014a).

A adição de policarbonatos traz vantagens na obtenção dos produtos finais, uma vez que acrescenta flexibilidade e pode modular a degradação dos poliésteres, bem como neutralizar a acidez local decorrente da hidrólise destes biopolímeros (DARGAVILLE et al., 2011; YANG et al., 2013). Assim como para com os poliésteres bioabsorvíveis, a biocompatibilidade e histocompatibilidade do agente plastificante trimetileno carbonato (TMC, do inglês *trimethylene carbonate*), um policarbonato, já foram testadas com sucesso em inúmeros modelos experimentais *in vitro* (DARGAVILLE et al., 2011; ROCHA et al., 2014; YANG et al., 2010) e *in vivo* (GUO et al., 2011; VAN LEEUWEN et al., 2012). Rocha et al. (2014) analisaram, *in vitro*, a proliferação e alongamento de células neuronais recuperadas de embriões de ratos Wistar junto à homopolímeros de PCL, TMC e à blenda PCL/TMC (na razão molar de 89 e 11%, respectivamente). Os autores verificaram não somente a compatibilidade das células neuronais com os biopolímeros, mas a nítida vantagem na associação do PCL/TMC em comparação aos outros materiais.

Outra questão que se impõe, enquanto que características dos biomateriais é a hidrofobicidade/hidrofilicidade das superfícies de contato com a biomoléculas, uma vez que a proliferação celular depende da adesão celular, e esta da interação das suas biomoléculas a nível intra e extracelular (integrinas, fibroactina e colágeno) com a superfície do material (AJIRO et al., 2014; ISHIZAKI; SAITO; TAKAI, 2010).

Kim et al, (2009), combinaram a BNC com o PLLA, com bons resultados em tanto que aumento da cristalinidade, da resistência tênsil e do módulo de elasticidade em favor do compósito de BNC-PLLA em comparação ao PLLA isolado. Os autores evidenciaram que o

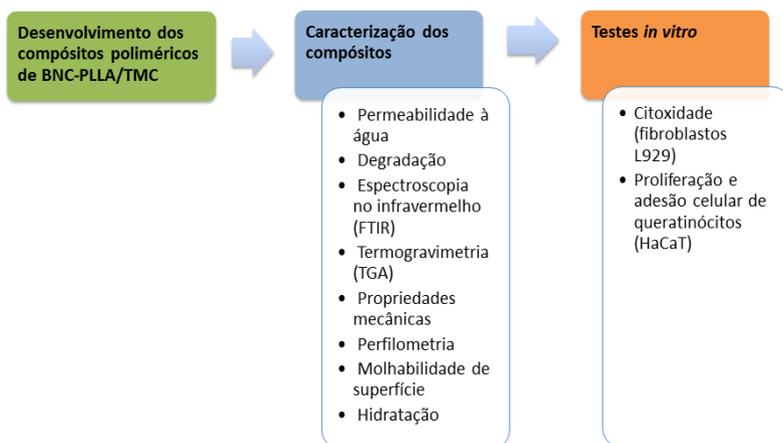
compósito, com as melhorias na sua performance mecânica, tem boa perspectiva de aplicações biomédicas e na indústria de alimentos e embalagens.

Com base no exposto, propõe-se o desenvolvimento de um novo compósito de BNC-PLLA/TMC, que agregue as propriedades de impermeabilidade à água, flexibilidade e biodegradabilidade inerentes à blenda de PLLA/TMC enquanto que preservando a resistência tênsil e estrutura porosa da BNC que permanece como o arcabouço final para a deposição, aderência, migração e proliferação das células envolvidas no processo de cicatrização da dura-máter, partes moles e pele fetal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

No diagrama de blocos da Figura 12 está representada a divisão, em 3 partes, das metodologias pertinentes a esta tese: desenvolvimento dos compósitos poliméricos de BNC-PLLA/TMC, caracterização físico-química dos mesmos e a realização de testes *in vitro*.

Figura 12 - Diagrama de blocos demonstrando as 3 etapas do trabalho e os experimentos realizados.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1 DESENVOLVIMENTOS DOS COMPÓSITOS POLIMÉRICOS DE BNC-PLLA/TMC

3.1.1 DEFINIÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS COMPÓSITOS DE BNC-PLLA/TMC

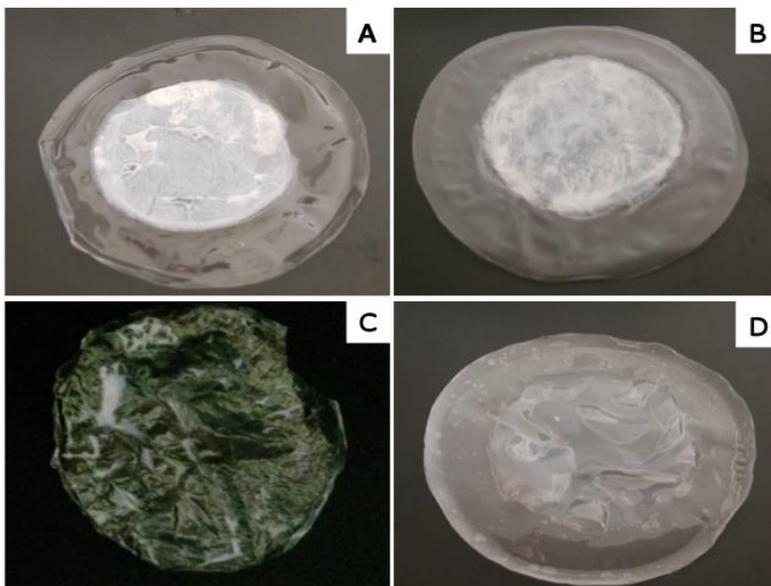
Os compósitos poliméricos foram desenvolvidos tendo em vista uma das suas aplicações finais de maior potencial (correção de mielomeningoceles intrauterina) observando-se características como aparência de superfície, morfologias, maleabilidade e exposição de 40 dias ao tampão fosfato-salino (PBS) + azida 0,02% m/v. Para isto, inicialmente foram testadas 3 combinações de blendas de PLGA (Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)) e PLLA/TMC (poli(L-ácido lático-co-trimetileno carbonato)), conforme na Tabela 3.

Tabela 3 - Subtipos de compósitos expostos ao PBS e azida 0,02% por 40 dias.

TIPO	DESCRIÇÃO
1	PLLA/TMC - 70/30
2	PLGA - 70/30
3	PLGA - 80/20

Em virtude da manutenção da maleabilidade após 40 dias de exposição ao PBS + azida 0,02%, optou-se pela blenda de PLLA/TMC, na razão molar de 70/30 m/m, para a elaboração dos compósitos poliméricos em associação com membranas liofilizadas de BNC (*G. hansenii*). Em seguida, foram testados arranjos, em bi ou tricamada, entre as membranas de BNC (hidratadas ou liofilizadas) e as lâminas de PLLA/TMC. Na Figura 13 estão representados exemplos destas opções.

Figura 13 - Exemplos dos compósitos poliméricos de BNC-PLLA/TMC. Em: A) compósito em dupla camada; B) compósito tricamada com BNC liofilizada por aposição; C) compósito tricamada de PLLA/TMC por imersão; D) exemplo de compósito tricamada por aposição empregando uma membrana de BNC hidratada.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

O compósito de BNC liofilizada e PLLA/TMC, elaborada por imersão em PLLA/TMC solubilizado em clorofórmio foi escolhido para os estudos subsequentes. Os pormenores dos métodos de produção dos mesmos estão relatados a seguir.

3.1.2 PRODUÇÃO DOS COMPÓSITOS DE BNC-PLLA/TMC

3.1.2.1 PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA

Para a produção das membranas de nanocelulose bacteriana (BNC, do inglês *Bacterial nanocellulose*), o meio de cultura foi preparado 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 diluídos em 1 L d'água destilada. O pH da solução foi ajustado para 6,5 e, em seguida, foi autoclavada por 20 min a 121°C (RECOUVREUX et al., 2008). As membranas de nanocelulose foram preparadas com a adição de 90% (v/v) do meio de cultura descrito anteriormente e 10% (v/v) de solução estoque de inóculo contendo a bactéria *Komagataeibacter hansenii* (*Gluconacetobacter hansenii* — ATCC 23769). Na síntese das membranas, as culturas foram mantidas em placas de cultura de 24 poços (15 mm de diâmetro) ou 6 poços (33 mm de diâmetro) (TPP®, Suíça). Em cada poço, foi adicionado 2 mL da formulação. A formação das membranas ocorreu na interface ar/líquido durante 12 dias de cultura mantida a temperatura de 26°C e sob condições estáticas de cultivo. Passados os 12 dias, as membranas de BNC foram retiradas das placas de cultura e, sucessivamente, purificadas. Esta etapa consiste na remoção de resíduos bacterianos e impurezas, através de soluções contendo NaOH 0,1 M, por 24 h a 50°C , seguido da lavagem com água destilada até atingir pH neutro. Posteriormente, as membranas foram esterilizadas em autoclave 121°C , a 1 atm, congeladas por 24 h e liofilizadas (Liotop®, L101, Brasil) por 48 h e estocadas em dessecador até o momento de uso.

3.1.2.2 PRODUÇÃO DOS COMPÓSITOS DE BNC-PLLA/TMC

Os compósitos poliméricos foram produzidos associando membranas de nanocelulose bacteriana (BNC) com a blenda polimérica de poli(L-ácido láctico-co-trimetileno carbonato) (PLLA/TMC) através da técnica de evaporação de solvente (*dip coating*). A blenda de PLLA/TMC (Resomer® LT706, Alemanha) copolimerizada na proporção

de 70/30 m/m através da técnica de polimerização por abertura de anel, foi dissolvida em clorofórmio PA a 10% m/v (ChCl₃ – Synth – Lab Synth, Diadema, Brasil) em temperatura ambiente. Após a dissolução completa da blenda polimérica essa solução foi vertida em um copo de Becker. As membranas de celulose liofilizadas foram então imersas na blenda solubilizada (*dip coating*) por, no mínimo, 30 s, até a aparente remoção das bolhas aéreas ao redor da celulose. Após drenagem do excesso da blenda polimérica, as membranas resultantes foram posicionadas individualmente em placas de Petri, à 21°C por 24h (para total evaporação do solvente) e depois levadas à geladeira por um período de 1 h a 4°C (para facilitar o desprendimento das membranas das placas vítreas). Ao final, foram obtidas blendas poliméricas de BNC e PLLA/TMC com íntima adesão entre as duas fases, resultando em uma membrana flexível e com a nanocelulose totalmente envolvida pelo PLLA/TMC. Em seguida, as membranas resultantes foram esterilizadas com uma mistura de óxido de etileno/dióxido de carbono (30/70) (Hospitec[®], São José-SC, Brasil).

3.1.2.3 MODIFICAÇÃO DOS COMPÓSITOS DE BNC-PLLA/TMC

Compósitos de BNC-PLLA/TMC originais foram modificados em uma das suas superfícies, através da aplicação de 20 µL de clorofórmio nas suas regiões centrais. Após intervalo de 20 segundos, a fina e circunscrita camada de PLLA/TMC parcialmente solubilizado foi removida com auxílio de hastes de algodão. Para cada compósito este procedimento foi repetido 3 vezes. Ao final, as membranas resultantes repousaram em ar ambiente por no mínimo 24 h, para a evaporação total do solvente. Os compósitos resultantes foram também esterilizados em óxido de etileno (Hospitec[®], São José-SC, Brasil).

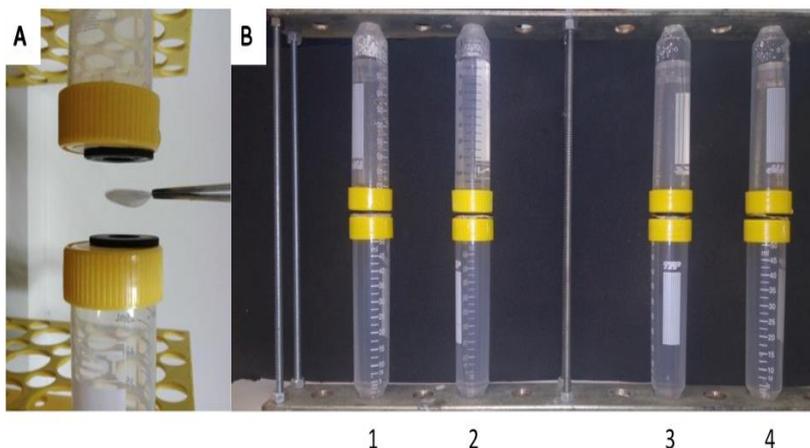
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPÓSITOS POLIMÉRICOS DE BNC-PLLA/TMC

3.2.1 TESTE DE PERMEABILIDADE À ÁGUA

A permeabilidade à água dos compósitos poliméricos de BNC-PLLA/TMC e das membranas de nanocelulose bacteriana foi determinada conforme o protocolo descrito a seguir.

O arranjo experimental constou de 4 conjuntos de 2 recipientes de poliestireno de 50 mL alinhados verticalmente, comunicados entre si através de um orifício central de 5 mm que por sua vez foi vedado pelo material de interesse (Figura 14).

Figura 14 - Sistemas teste de permeabilidade à água para as membranas de BNC puras e compósitos poliméricos de BNC-PLLA/TMC. Em A) Detalhe da interposição do biomaterial entre os frascos superior e inferior de cada sistema teste; B) Arranjo de 4 unidades dos sistemas teste, BNC pura (posições 1 e 2), e compósito de BNC-PLLA/TMC (posições 3 e 4).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Inicialmente, os recipientes superiores continham 40 mL de água destilada e os inferiores permaneceram vazios. A passagem de água do frasco superior ao inferior foi acompanhada e medida em ambos os frascos em função do tempo (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 7; 14; 21; 40; 60 e 90 dias). A cada tempo, foi determinado o volume de água coletado no frasco inferior e calculado o percentual de passagem de água do frasco superior ao inferior através da Equação 1.

$$\%F_s F_i = (F_i / F_s) \times 100 \quad (1)$$

Onde % $F_s F_i$ representa a percentagem de passagem de água do frasco superior ao frasco inferior, F_i a quantidade de água fluida ao frasco inferior e F_s a quantidade inicial de água no frasco superior.

3.2.2 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO DOS COMPÓSITOS POLIMÉRICOS DE BNC-PLLA/TMC

Amostras dos compósitos poliméricos de BNC-PLLA/TMC foram inicialmente identificadas (t_0), pesadas, esterilizadas, imersas em 1 mL de solução tampão fosfato (PBS com 0,02% de azida sódica estéril), e depois devidamente acomodadas em placas individuais de poliestireno de 24 poços (TPP-AG[®], Switzerland). Os conjuntos foram mantidos à temperatura de 37°C e sob agitação contínua à 80 RPM. A degradação dos compósitos foi avaliada em função do tempo (0, 7, 14, 30, 60 e 90 dias) com renovação do PBS semanalmente. Nos tempos descritos, os compósitos foram retirados do meio de degradação, lavados em água destilada, secos e depois congelados. A variação do pH das soluções residuais foi determinada a cada 7 dias. Em seguida, as amostras foram analisadas através da Cromatografia por Permeação em Gel (GPC - do inglês *Gel Permeation Chromatography*) para determinação das massas molares, bem como foi estudada a morfologia de superfície e da secção transversal de cada amostra através de análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) nos tempos descritos.

3.2.2.1 CROMATOGRAFIA POR PERMEAÇÃO EM GEL

Para as análises por cromatografia por permeação em gel (GPC) as amostras dos compósitos poliméricos de BNC-PLLA/TMC foram obtidas a cada tempo dos ensaios de exposição ao PBS. As análises foram realizadas em triplicata, sendo que para cada análise foram utilizados 0,02g de amostra liofilizada (equivalente a 2 compósitos), solubilizadas em 4 mL de tetrahidrofurano (THF) por 24 h. A solução foi então filtrada em filtro 0,45 micra e depois analisada em equipamento Shimadzu (Brasil) elétrico modelo LC-20AD. As médias ponderais das massas molares (M_w), obtidas através das medições do cromatógrafo, foram anotadas, em kilo Daltons (kDa), bem como determinado o índice de polidispersão (M_w/M_n) onde M_n indica a massa molar numérica média. Os resultados foram submetidos à análise estatística (Software Origin Pro[®], versão 8.5.d, EUA) com determinação

das médias aritméticas e erros padrão da média, seguidos de ANOVA de uma via com teste de Tukey e intervalo de confiança $<0,05$.

3.2.2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os compósitos de BNC-PLLA/TMC a ser analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram seccionados longitudinalmente, originando duas metades, que foram então dispostas horizontal e verticalmente (secção transversal) sobre a superfície dos *stubs*, para então serem metalizadas com uma camada de ouro-paládio e coladas com fita de carbono dupla face nos recipientes de suporte. Para as análises, foi empregado o microscópio eletrônico (JEOL JSM-6390LV), com fonte de elétrons de tungstênio, detector de elétrons secundários e nas tensões entre 10 e 15 kV, localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para cada amostra, foram obtidos, no mínimo, 4 registros com diferentes ampliações.

No intuito de correlacionar os achados citológicos com a morfologia de superfície dos compósitos modificados, amostras pós fixadas com formaldeído e coradas por DAPI-Faloidina, foram desidratadas com álcool em doses crescentes (30 a 100%), seguidas com lavagens de soluções de HMDS (hexametildissilazano) de concentrações também crescentes (30 a 100%), sendo em seguida removidas da solução HMDS 100% e repousadas sobre papel absorvente para evaporação do solvente orgânico. As amostras foram distribuídas sobre fitas de carbono aderidas aos *stubs* e, então, recobertas com uma dupla camada de carbono. Após o recobrimento, as amostras foram escaneadas por MEV utilizando o microscópio eletrônico (JEOL JSM-6390LV), com fonte de elétrons de Tungstênio, detector de elétrons secundários e nas tensões entre 10 e 15 kV, localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), UFSC.

3.2.3 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Amostras de BNC e de compósitos de BNC-PLLA/TMC originais e recuperados após 30, 60 e 90 dias de exposição ao PBS + azida 0,02%, foram analisadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), realizada no instrumento modelo TENSOR 27 (Bruker,

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

A determinação dos picos expressos em cada leitura foi representada graficamente.

3.2.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

Amostras de 20mg de membranas de BNC, blendas de PLLA/TMC, compósitos BNC-PLLA/TMC originais e expostos aos PBS por 30, 60 e 90 dias foram pesadas em um cadinho de cerâmica (Al_2O_3) e conduzidas a uma faixa de aquecimento de 20°C a 850°C, com taxa incremental de 10°C min^{-1} e sob atmosfera de nitrogênio contínua de 40 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. As análises de TGA foram realizadas no Laboratório de Controle de Processos e Polimerização do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, no equipamento STA modelo 443 F3 Jupiter, marca Netzsch, Alemanha. As variações de massa obtidas no tempo e em função das temperaturas de aquecimento, bem com as derivadas (dm/dT) em função da temperatura foram calculadas e representadas graficamente (Software Origin Pro[®], versão 8.5.d, EUA).

3.2.5 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Membranas liofilizadas de BNC, amostras secas de PLLA/TMC e de compósitos de BNC-PLLA/TMC, foram recortadas em formatos retangulares de 35 mm de comprimento, com 5 mm de largura e espessura média de 0,1 mm. Amostras similares de cada grupo, permaneceram 12 h em solução de PBS a 37°C. Os testes uniaxiais foram realizados utilizando o texturômetro TA.HD plus Texture Analyser, Stable Micro Systems[®] (Inglaterra), com uma distância inicial de 10 mm entre as garras do sistema, carga de 500 N e velocidade de deslocamento de 1 $\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$. O módulo de elasticidade (módulo de Young) foi determinado a partir da determinação do coeficiente angular da porção linear inicial das curvas tensão/deformação (tipicamente no intervalo entre 0,5% e 10% de deformação dos materiais). As tensões e deformações máximas à ruptura foram obtidas através da anotação das coordenadas “x” e “y” das curvas tensão/deformação no momento da ruptura dos materiais durante os testes mecânicos. Para cada biomaterial, triplicatas foram realizadas e os diferentes materiais

comparados entre si estatisticamente através de ANOVA de uma via, e análise pos-hoc com teste de Tukey para $p < 0,05$.

3.2.6 PERFILOMETRIA

A rugosidade de membranas liofilizadas de BNC, de blendas de PLLA/TMC, de compósitos de BNC-PLLA/TMC originais e de compósitos de BNC-PLLA/TMC modificados foi determinada através de perfilometria a laser. Amostras de cada biomaterial foram recobertas com Au e analisadas em um perfilômetro de marca Zygo Newveiw 7300. Foram feitas análises em triplicatas, analisando três regiões distintas em cada amostra. As imagens foram processadas e tratadas estatisticamente no programa Moutains Map Premium (64-bit version) e os resultados anotados como média e erro padrão. Os dados foram submetidos a análise ANOVA de uma via com teste de Tukey, com intervalo de confiança $< 0,05$.

3.2.7 MOLHABILIDADE DE SUPERFÍCIE

O grau de molhabilidade das membranas de BNC, PLLA/TMC, CP (compósitos de BNC-PLLA/TMC) e CPMOD (compósitos de BNC-PLLA/TMC modificado em uma das superfícies), foi analisado através das medidas dos ângulos de contato entre gotas d'água e a superfície de cada biomaterial. Para tanto, gotas d'água destilada foram posicionadas sobre 3 pontos diferentes das superfícies. Os ângulos de contato foram medidos através das imagens obtidas com a utilização do goniômetro modelo Ramé Hart 250-F1/*software* DropImage[®] (Nova Jérsei, EUA). Os testes foram realizados à temperatura de 21°C e com umidade do ar de 50%. Para cada biomaterial foram utilizadas 3 amostras. Os dados resultantes foram analisados por ANOVA de uma via com teste de Tukey e intervalo de confiança $< 0,05$.

3.2.8 CAPACIDADE DE HIDRATAÇÃO

A capacidade de hidratação de membranas liofilizadas de BNC, de blendas de PLLA/TMC, de compósitos de BNC-PLLA/TMC originais e de compósitos de BNC-PLLA/TMC modificados foi determinada ao se mergulhar 3 amostras de cada biomaterial em soluções individuais de PBS + azida 0,02% e depois mantidos por 7 dias a 37°C. Nos tempos pré-determinados (6 h, 24 h e 7 dias), as amostras

foram removidas das respectivas soluções, os excessos de água delicadamente removidos com auxílio de papel filtro e pesadas. A capacidade de hidratação dos materiais foi determinada como o percentual de ganho de massa através da Equação 2:

$$\% \text{Ganho de massa} = ((p_f - p_i) / p_i) \times 100 \quad (2)$$

Onde p_f é o peso final e p_i o peso inicial dos biomateriais sob experimentação.

3.3 ENSAIOS *IN VITRO*

3.3.1 ATIVIDADE METABÓLICA DE FIBROBLASTOS L929 EM CONTATO DIRETO COM COMPÓSITOS DE BNC-PLLA/TMC – QUANTIFICAÇÃO PELO MTS

A atividade metabólica de fibroblastos de tecido conectivo de camundongo, linhagem L929, após exposição das células à BNC, ao PLLA/TMC e ao compósito BNC-PLLA/TMC, foi avaliada pelo ensaio do contato direto e quantificada pelo método MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). O teste colorimétrico MTS estima a atividade mitocondrial na presença de metossulfato de fenazina (PMS), produzindo cristais de formazan, que são lidos por absorvância à 490 nm. Os ensaios foram repetidos em dois experimentos independentes considerando-se triplicata de amostras para cada uma das repetições que foram realizadas de acordo com a metodologia descrita a seguir.

Fibroblastos L929, mantidos em nitrogênio líquido, foram descongelados e cultivados em meio de cultura DMEM (do inglês *Dulbecco's modified Eagle's medium*, Gibco[®], EUA). O meio de cultura foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco[®], EUA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco[®], EUA) e as células em cultura foram mantidas em atmosfera úmida, à temperatura de 37°C com 5% de CO₂, em placa de cultura de tecidos (TPP, Suíça) para a propagação celular. Após atingir a confluência de 80% de preenchimento das superfícies das placas de cultura, as mesmas foram lavadas 3 vezes com uma solução de PBS para a remoção das proteínas do soro fetal bovino (SFB). Em seguida, foi adicionada uma solução de tripsina 0,02% (Gibco[®], EUA), em volume suficiente para cobrir as células, e as placas foram transferidas para a estufa (Ultrasafe HF 212UV) durante 5 min para a

ativação da tripsina e descolamento das células aderidas na placa de cultura. Na cabine de segurança biológica, a tripsina e as células foram transferidas para tubos de plástico de 2 mL e centrifugadas por 2 minutos a 24°C e 5000 RPM, originando uma solução sobrenadante a ser removida (tripsina) e o pellet (as células), que foi novamente suspenso em meio de cultura para que as células viáveis fossem quantificadas utilizando-se uma câmara de Neubauer (SP Labor, Brasil).

Os fibroblastos foram então semeados em placas de cultura de 24 poços, na densidade celular de 18.000 células/poço, contendo 300 µL de meio de cultura DMEM e mantidos na estufa (Ultrasafe HF 212UV), em atmosfera úmida, à temperatura de 37°C e com 5% de CO₂ por 24 h. Após este período, amostras de BNC, PLLA/TMC e BNC-PLLA/TMC foram adicionadas sobre as células em cultura. Três poços de cultura foram mantidos sem a inclusão de material para o controle do crescimento celular nas placas isoladamente. Após o tempo de cultura de 1, 3 e 7 dias, as amostras de BNC, PLLA/TMC e BNC-PLLA/TMC foram removidas. As células em cultura foram lavadas com PBS (três vezes) e 300 µL de meio de cultura e 60 µL do reagente MTS foram adicionados em cada poço de cultura, para em seguida ser incubadas por 3 h em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após a incubação, cada solução foi homogeneizada e 100 µL de cada amostra foi transferida para uma placa de 96 poços (TPP-AG[®], Switzerland). A absorbância das soluções foi medida em 490 nm em espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA). O efeito das amostras (BNC, PLLA/TMC e BNC-PLLA/TMC) sobre a atividade metabólica dos fibroblastos L929 foi calculado comparando-se a blenda BNC-PLLA/TMC às amostras de BNC e ao PLLA/TMC. Os dados foram tratados estatisticamente através do método ANOVA considerando-se o teste de Tukey para p<0,05.

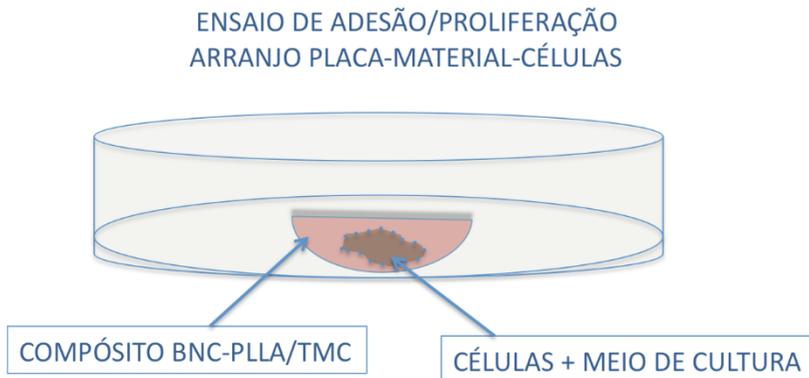
3.3.2 ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCaT)

A adesão e proliferação de queratinócitos humanos de linhagem imortalizada (HaCaT) cultivados sobre membranas liofilizadas de BNC, blendas de PLLA/TMC, compósitos de BNC-PLLA/TMC originais (CP) e compósitos de BNC-PLLA/TMC (CPMOD) modificados foram caracterizadas, qualitativa e quantitativamente através das análises de microscopia confocal e determinação das concentrações de DNA estimadas pela técnica do Pico Green[®], respectivamente, conforme os protocolos abaixo descritos.

3.3.2.1 DESENHO EXPERIMENTAL

A avaliação das propriedades de adesão e proliferação de queratinócitos humanos (HaCaT) em compósitos poliméricos de BNC-(PLLA/TMC) e suas matrizes poliméricas, elaborados conforme descrito nas seções 3.1.2.1 e 3.1.2.2 e 3.1.2.3 deste manuscrito, seguiu o desenho experimental disposto nas Figuras 15 e 16. A Figura 15 demonstra, de maneira esquemática, a disposição de cada unidade do conjunto placa, material, meio de cultura e células utilizadas nestes ensaios.

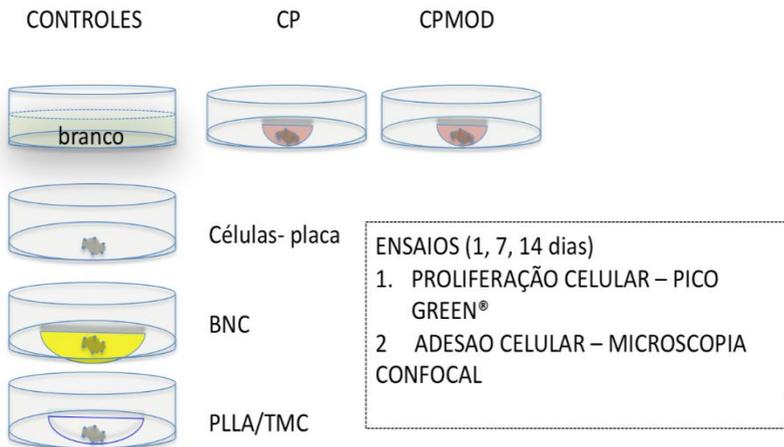
Figura 15 - Diagrama demonstrando o arranjo placa-biomaterial-células para ensaios *in vitro* de adesão e proliferação de queratinócitos humanos em compósitos de BNC-PLLA/TMC.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 16 estão representados, de maneira esquemática, os grupos e controles relativos aos ensaios de adesão e proliferação celular em questão.

Figura 16 - Diagrama representando os grupos e ensaios necessários para a caracterização *in vitro* da atividade metabólica celular e adesão celular de queratinócitos (HaCaT) humanos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.2.2 CULTURA DE CÉLULAS HaCaT SOBRE OS BIOMATERIAIS

As células HaCaT, mantidas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e cultivadas em meio de cultura celular Medium 106/LSGS (Gibco®) e Medium 154 (Gibco®), respectivamente, suplementados com 10% m/v de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®) e 1% m/v de penicilina/estreptomicina (Gibco®). A propagação celular se deu em placas de cultura de tecidos (TPP-AG®, Switzerland), sob atmosfera úmida a 37°C, com 5% v/v de CO₂. Após atingir a confluência de 80%, as células foram lavadas três vezes com uma solução PBS para a remoção das proteínas do SFB da superfície das mesmas. Após as placas de cultura receberem 1 mL de solução TrypLE™, Gibco®), foram então transferidas para a estufa incubadora (Ultrasafe HF® 212UV) por 5 minutos para a ativação da tripsina e descolamento das células aderidas às placas de cultura. Na cabine de segurança biológica, as células em suspensão foram remanejadas para tubos de plástico de 2 mL e centrifugadas por 2 minutos a 24°C e 1.200 RPM. A solução sobrenadante foi removida e o *pellet* resultante (as células), foi resuspendido em meio de cultura e quantificado em câmara de Neubauer

(SP LABOR, Brasil). Os queratinócitos, quantificados em $5 \cdot 10^5$ células, juntamente com 2 mL do meio de cultura, foram semeados sobre cada biomaterial depositado ao fundo de cada um dos poços das placas de cultura de tecidos (TPP-AG[®], Switzerland). O meio de cultura foi adicionado sobre cada membrana de maneira que não ocorresse transbordamento e perda de células para o fundo das placas. Os conjuntos foram mantidos em atmosfera úmida, a 37°C com 5% v/v de CO₂. Exceto para as análises de 24 h, os meios de cultura foram trocados a cada 2 dias até o término dos períodos experimentais de 7 e 14 dias cultura. Ao final de cada tempo de análise, as células foram lavadas em PBS (3 vezes) e os ensaios seguiram as rotinas abaixo descritas para análise por microscopia confocal e quantificação de DNA pela técnica do PicoGreen[®]

3.3.2.3 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Para avaliação por microscopia confocal as células foram fixadas com formaldeído a 4%, permeabilizadas com 0,2% de Triton X-100 em PBS, para, então, em ambiente escurecido, serem coradas com Alexa Fluor 546/Faloidina (Molecular Probes Inc., Eugen, OR, USA) e DAPI (sal dihidroclorídrico, 4',6- diamidino-2-fenilindol), (Molecular Probes Inc., Eugen, OR, EUA). Em seguida, as membranas fixadas foram montadas em lâminas para as análises por microscópicas utilizando o microscópio confocal, Leica DMI6000 B (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Alemanha) disponível no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME).

3.3.2.4 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA PELA TÉCNICA DO PICO GREEN[®]

A proliferação celular dos queratinócitos em contato com os 4 biomateriais foi avaliada pelo ensaio fluorimétrico que quantifica o montante de dsDNA presente nos lisados celulares, através do reagente PicoGreen[®] (Invitrogen, USA), como descrito pelo fabricante.

Após serem lavadas em PBS, amostras dos biomateriais contendo as células cultivadas por 1, 7 e 14 dias de cultura foram transferidas para poços de outra placa, acrescidas de 1 mL de água ultrapura e mantidas em atmosfera úmida à temperatura de 37°C com 5% de CO₂ por 1 h e depois armazenadas em ultrafreezer -80°C (Nuair, EUA) até o uso. No

momento da quantificação do dsDNA, o material foi descongelado e centrifugado a 2000 RPM por 10 min. Em poços individuais de uma placa de 96 poços foi realizada a seguinte mistura: 28,7 μL das amostras de interesse com 71,3 μL da solução de PicoGreen[®] ($2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) diluídos em tampão TE e incubados por 5 min. As intensidades das fluorescências das soluções foram medidas com um espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA) com excitação em 480 nm e emissão em 520 nm. A quantificação da concentração de dsDNA foi realizada pela equação da curva padrão preparada a partir do padrão de λ -DNA. Para cada ensaio foram utilizadas triplicatas de cada amostra, com medição dupla das fluorescências. Os ensaios foram repetidos 3 vezes e os dados resultantes expressos como a média aritmética e erro padrão da média e em seguida analisados por ANOVA de uma via com teste de Tukey e intervalo de confiança $p < 0,05$.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram, exceto quando indicado, avaliados estatisticamente através do *software* (Origin Pro, versão 8.5, EUA) e expressos como a média aritmética e erro padrão da média e posteriormente comparados através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO DOS COMPÓSITOS DE BNC-PLLA/TMC

Para o desenvolvimento e a escolha dos compósitos poliméricos levou-se em consideração a maleabilidade inicial e após 40 dias de exposição à uma solução de PBS + azida 0,02% m/v. As blendas de PLGA, independentemente da espessura de BNC utilizada, ou da razão molar dos componentes das mesmas, demonstraram-se bastante rígidas após poucos dias (5 dias) de imersão em PBS, tornando-as inadequadas para a aplicação conformacional junto à medula espinhal displásica fetal. As blendas de BNC com PLLA/TMC demonstraram boa condição de maleabilidade inicial e que se manteve ao longo dos 40 dias de exposição ao PBS.

Conceitualmente, pensava-se em uma blenda bicamada, uma externa, hidrofílica e porosa (compatível com a BNC), o que favoreceria a efetiva adesão e proliferação celular; e outra, interna, impermeável à água e lisa (compatível com o PLLA/TMC), que isolaria o espaço subaracnóideo do nocivo líquido amniótico e minimizaria a ocorrência de aderência de raízes nervosas à nova dura-máter. No entanto, após período de exposição inicial ao PBS, observou-se o desprendimento completo entre a fase da BNC e a do PLLA/TMC. Em contrapartida, o arranjo em tricamada por imersão e evaporação do solvente, manteve os materiais justapostos sem prejuízo à maleabilidade. Em virtude destes resultados, decidiu-se explorar este tipo de compósito BNC-PLLA/TMC, produzindo-as em 2 tamanhos para os diversos ensaios propostos, conforme medidas demonstradas na Tabela .

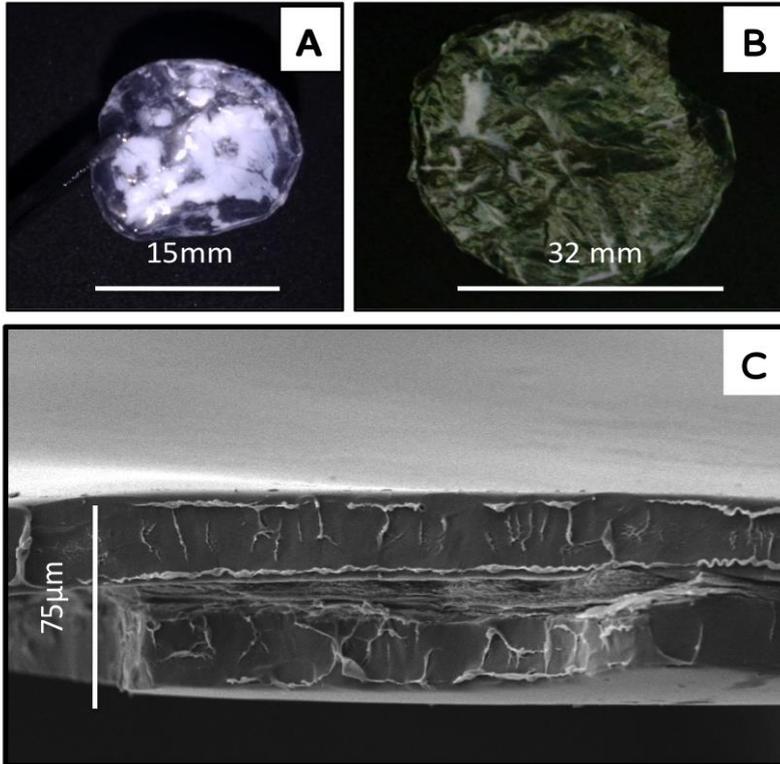
Tabela 4 - Dimensões e massas dos compósitos de BNC-PLLA/TMC produzidos nos tamanhos A e B.

	DIÂMETRO E ESPESSURA (MÉDIAS COM DP - mm)	MASSAS (MÉDIAS COM DP - mg)
TAMANHO A	15,4 (± 1,4) e 0,1 (± 0,025)	10,82 (± 1,2)
TAMANHO B	32,3 (± 0,9) e 0,1 (± 0,02)	80,83 (± 8,4)

Fonte: elaborado pelo autor.

A Figura 17 apresenta fotos dos compósitos poliméricos produzidos nos 2 tamanhos e uma micrografia da seção transversal de uma amostra.

Figura 17 – Compósito polimérico de BNC-PLLA/TMC. Em: A) aspecto macroscópico com visão de superfície (tamanho A); B) aspecto macroscópico com visão de superfície (tamanho B); C) visão da seção transversal à MEV.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

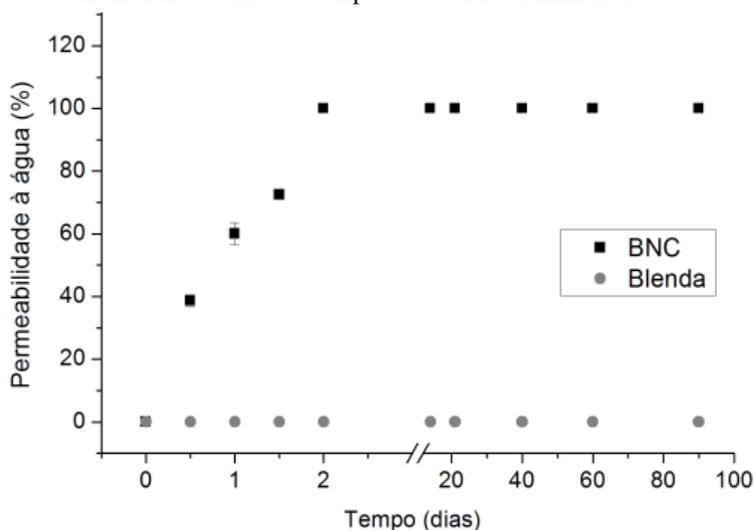
Os compósitos poliméricos de BNC-PLLA/TMC resultantes foram produzidos acompanhando o formato circular das BNC, nos 2 tamanhos descritos, e em número suficiente para a realização dos ensaios.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS BLENIDAS DE BNC-PLLA/TMC

4.2.1 PERMEABILIDADE À ÁGUA

A Figura 18 demonstra a percentagem de água transposta do frasco superior ao frasco inferior através das membranas de nanocelulose bacteriana (BNC) e compósitos BNC-PLLA/TMC ao longo dos 90 dias de ensaios.

Figura 18 - Percentagem de água transposta do frasco superior ao frasco inferior através de membranas de BNC e compósitos de BNC-PLLA/TMC.



Fonte: elaborado pelo autor.

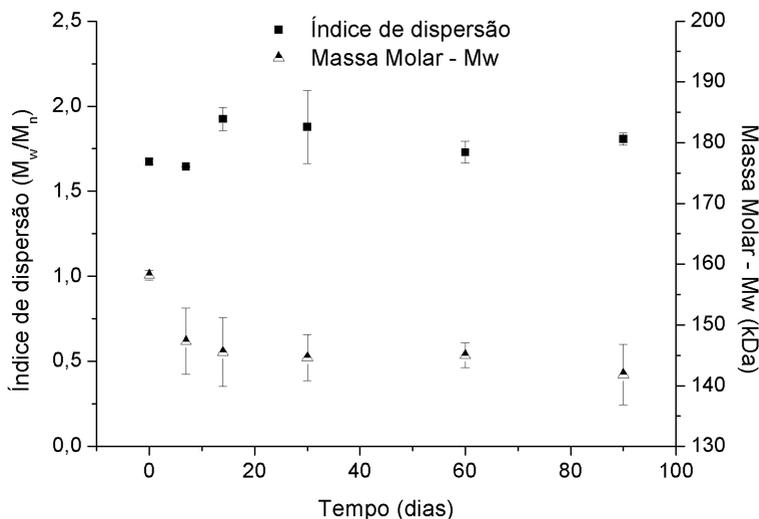
As membranas de BNC demonstraram-se permeáveis à água, com total escoamento de água do frasco superior ao frasco inferior do arranjo em 48 h de experimento. Este resultado é corroborado por dados de literatura que evidenciam a porosidade e hidrofilicidade das membranas de BNC (GODINHO et al., 2016; STUMPF et al., 2013). De outra maneira, os compósitos de BNC-PLLA/TMC não foram permeáveis à água em até 90 dias, o que é explicado pela hidrofobicidade da blenda de PLLA/TMC (FUKUSHIMA, 2015; LI et al., 2014). Li et al. (2014) estudaram blendas de PLLA/TMC e PLLA/PTMC (poli(L-ácido lático-co-poli-trimetileno carbonato)) com diversas frações de TMC e PTMC, tendo evidenciado que o aumento da

fração molar de TMC em relação ao PLLA confere menor permeabilidade ao vapor d'água.

4.2.2 ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DOS COMPÓSITOS DE BNC-PLLA/TMC

A Figura 19 demonstra a evolução das médias ponderais das massas molares (M_w) das amostras de compósitos de BNC-PLLA/TMC e os respectivos índices de dispersão (M_w/M_n) em diferentes tempos de exposição ao PBS, obtidas através de análises por GPC. A M_w e o índice de dispersão (M_w/M_n) dos compósitos de BNC-PLLA/TMC não expostos à solução de PBS + azida 0,020% foi de 158 ($\pm 0,8$) kDa e 1.67 ($\pm 0,01$), respectivamente, caracterizando uma blenda de alto peso molecular e bastante homogênea (CANEVAROLO, 2004).

Figura 19 - Massas molares ponderadas (M_w) e índice de dispersão (M_w/M_n) dos compósitos de BNC-PLLA/TMC expostos ao PBS durante 90 dias.



Fonte: elaborado pelo autor.

A curva inferior da Figura 19 demonstra que as médias ponderadas das massas molares (M_w) dos compósitos analisados variaram minimamente ao longo dos 90 dias de exposição ao PBS + azida 0,02%, porém sem significância estatística após ANOVA de uma

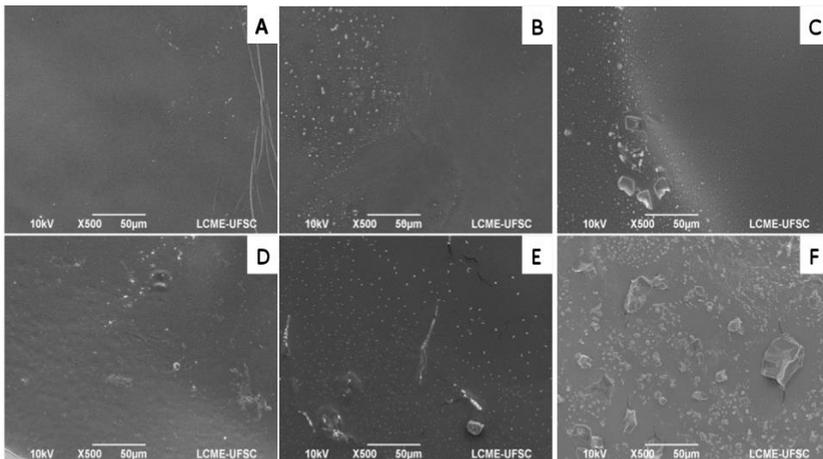
via com teste de Tukey e intervalo de confiança $p < 0,05$. Este padrão de degradação está associado à introdução do componente TMC junto ao PLLA. O TMC aumenta a hidrofobicidade do conjunto, o que, em última instância, limita a degradação por hidrólise dos compósitos (DARGAVILLE et al., 2011; FENG; ZHUO; ZHANG, 2012). No entanto, outros autores sugerem que com o aumento da fração molar de TMC, aumentar-se-ia o ritmo da degradação da blenda (LI et al., 2013). Dargaville et al. (2011) estudaram a degradação de blendas de PLLA/TMC com variação de 30 a 70% m/m de TMC na composição final. Após 84 dias de degradação hidrolítica em PBS, os autores sugerem que, tão importante quanto a fração molar do componente TMC nestas blendas, a cristalinidade e as respectivas massas molares são relevantes à biodegradabilidade dos materiais.

A curva superior da Figura 19 ilustra a evolução do índice de dispersão (M_w/M_n) das massas molares obtidas através das análises por GPC. Este índice variou entre 1,64 (exposição de 7 dias) e 1,92 (exposição de 14 dias), indicando uma dispersão estreita, compatível com cadeias poliméricas de tamanho mais uniforme (CANEVAROLO, 2004). Não houve diferença estatística entre os pontos obtidos, bem como não ocorreu alargamento da dispersão, o que é compatível com a manutenção da homogeneidade das amostras e degradação negligenciável (LI et al., 2013).

As fotos das superfícies e das secções transversais dos compósitos de BNC-PLLA/TMC, obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), estão dispostas nas Figuras 20 e 21.

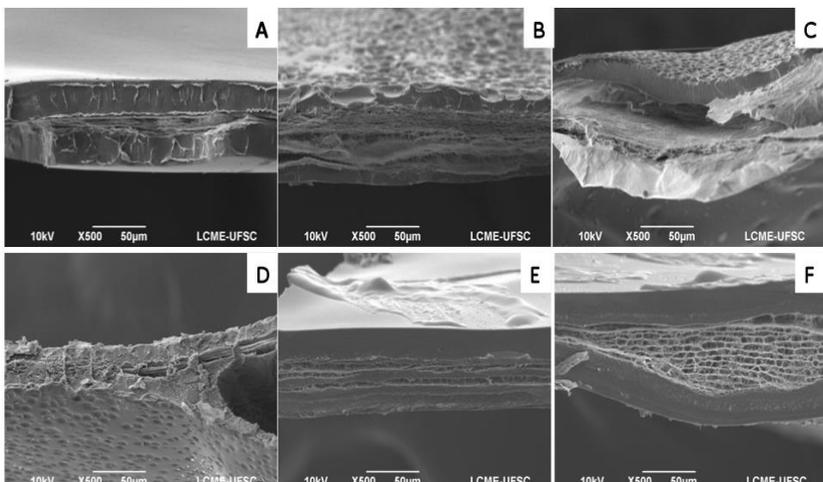
As análises de superfície demonstram a homogeneidade das amostras, não havendo, mesmo em 90 dias, sinais morfológicos de degradação visível, sejam erosões, rupturas ou achatamentos. Nota-se, já a partir do sétimo dia de exposição, a deposição de cristais de superfície, ricos em sódio e cálcio (após análise por EDS, Espectroscopia por Dispersão de Raio x, do inglês *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*).

Figura 20 - Aspecto à Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies dos compósitos de BNC-PLLA/TMC expostos à solução de PBS/azida 0,02%. Aumento de 500x. Em: A) tempo zero; B) 7 dias; C) 14 dias; D) 30 dias; E) 60 dias e F) 90 dias de exposição.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 21 – Aspecto à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das secções transversais dos compósitos de BNC-PLLA/TMC expostos à solução de PBS/azida 0,02%. Aumento de 500x. Em: A) tempo zero; B) 7 dias; C) 14 dias; D) 30 dias; E) 60 dias e F) 90 dias.



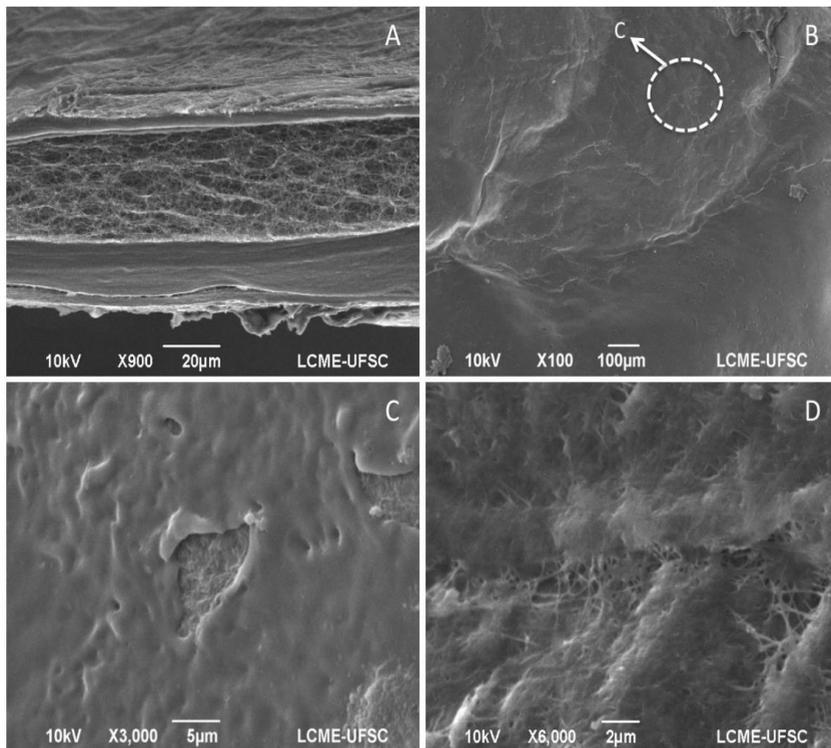
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

As análises por MEV das seções transversais dos compósitos de BNC-PLA/TMC demonstram o aspecto das suas 3 camadas constituintes: uma camada de BNC envolta por um extrato superior e inferior de PLLA/TMC. Nota-se, em todas as amostras, que as 2 fases apresentam íntima relação, com penetração do PLLA/TMC através da trama fibrilar da BNC. Nas fotos B, C e D observa-se irregularidade de superfície junto à fase do PLLA/TMC, interpretado como artefatos formados por microbolhas durante a fase de imersão e evaporação do solvente durante a elaboração das blendas.

Morfologicamente, através das análises por MEV, não se detectaram sinais compatíveis com degradação em 90 dias. Outros autores obtiveram resultados semelhantes, sobretudo em estudos *in vitro*, uma vez que a degradação inicial é bastante tênue e devida exclusivamente à hidrólise (DARGAVILLE et al., 2011; MOCHIZUKI; HIRAMI, 1997). Li et al. (2013) em um estudo de degradação *in vitro* de blendas poliméricas variadas, incluindo amostras de PLLA/TMC 50/50 m/m, com 300 dias de duração, detectaram erosões na superfície e secção transversal dos blendas analisadas à MEV. Experimentos *in vitro* com degradação enzimática (DONG et al., 2014a) e *in vivo* (GUO et al., 2011; VAN LEEUWEN et al., 2012) demonstram degradação mais acelerada do PLLA/TMC. Dong et al. (2014a) analisaram o comportamento *in vitro* de blendas poliméricas variadas (PLLA, PLLA/TMC (95/5), PLLA/TMC/GA) em diversas proporções de frações molares) expostos a uma solução de PBS com proteinase K. Ao final do estudo (exposição de 30 dias), verificou-se perdas de 20% de 40% de massas molares e massas, respectivamente, para o PLLA/TMC 95/5, indicando que a degradação enzimática, tal como ocorre em organismos vivos, é capaz de acelerar a degradação e absorção de poliésteres e policarbonatos.

Dado que os compósitos de BNC-PLLA/TMC resultaram em membranas de superfície pouco rugosas, decidiu-se pela modificação de uma das suas superfícies através da aplicação de pequenas quantidades de clorofórmio, seguida da remoção mecânica das porções de PLLA/TMC solubilizadas. A Figura 22, apresenta micrografias obtidas por MEV documentando tais modificações.

Figura 22 – Micrografias por MEV dos compósitos modificados. Em: A) secção transversal com camada superior modificada, aumento de 900X; B) a visão de superfície com transição entre o centro (superfície modificada) e a periferia mais regular, aumento de 100X; C) detalhe de camada de PLLA/TMC afilada com exposição parcial da BNC, aumento de 3000x; D) visão aproximada da superfície da BNC com fibras entremeadas pelo PLLA/TMC, aumento de 6000X.



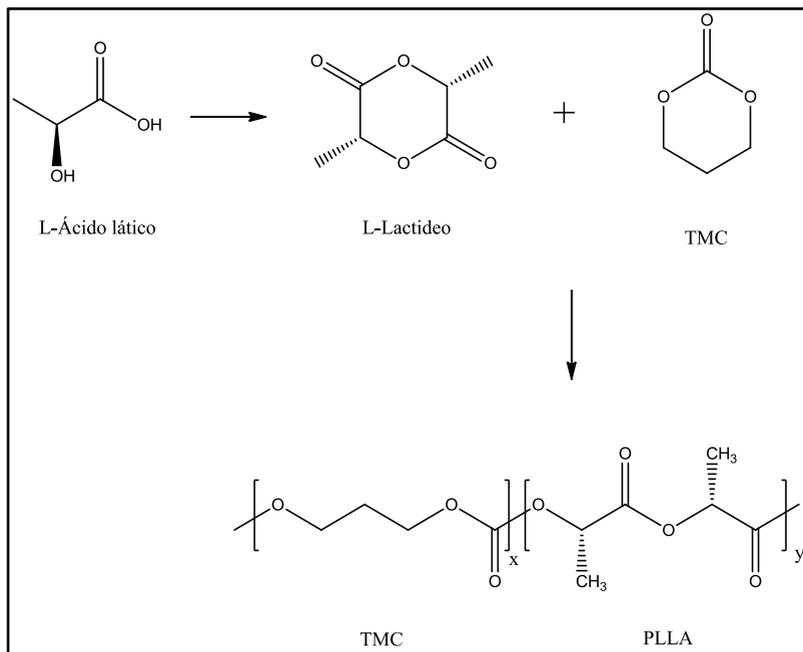
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Através das análises da figura 22, pode-se observar que os compósitos foram efetivamente modificados, resultando em superfícies de relevo mais irregular, inclusive com áreas de exposição da trama nanofibrilar correspondente à BNC. Os novos compósitos modificados foram então caracterizados através de testes de rugosidade, capacidade de hidratação e testes de ângulo de contato, bem como foram adicionados aos grupos de biomateriais para os testes de proliferação e adesão de queratinócitos *in vitro*.

4.2.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Na Figura 23 observa-se a estrutura química da blenda de PLLA/TMC, enquanto que na Figura 24 estão representadas as análises por FTIR de amostras de BNC e compósitos de BNC-PLLA/TMC originais e expostos ao PBS em até 90 dias.

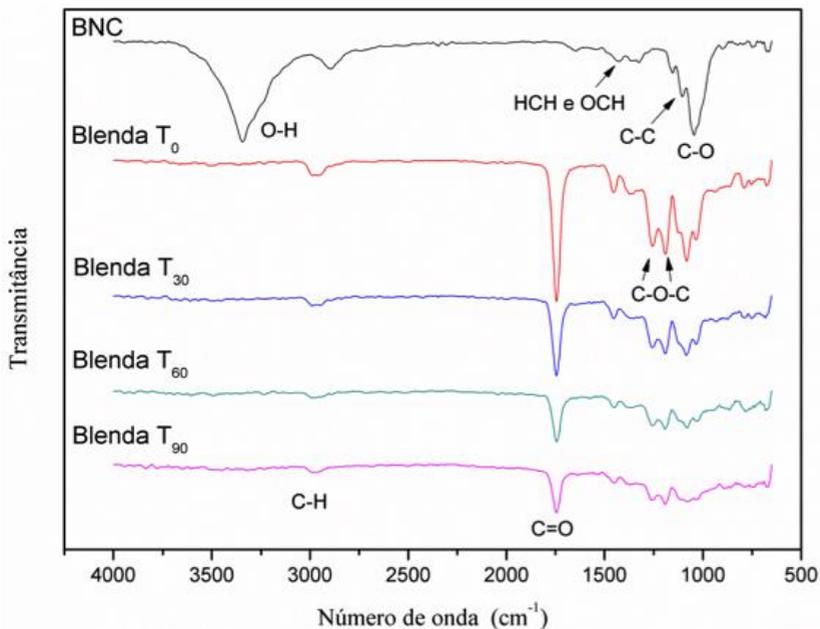
Figura 23– Estrutura química da blenda de PLLA/TMC.



Fonte: elaborado pelo autor.

A Figura 23, na sua porção inferior, mostra a estrutura química da blenda de PLLA/TMC, resultado da polimerização por abertura de anel entre o PLLA e o trimetileno carbonato. Os picos de transmitância por análise FTIR estão representados a seguir.

Figura 24 - Análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) de amostras de BNC e compósitos poliméricos de BNC-PLLA/TMC originais e expostos ao PBS por 30, 60 e 90 dias.



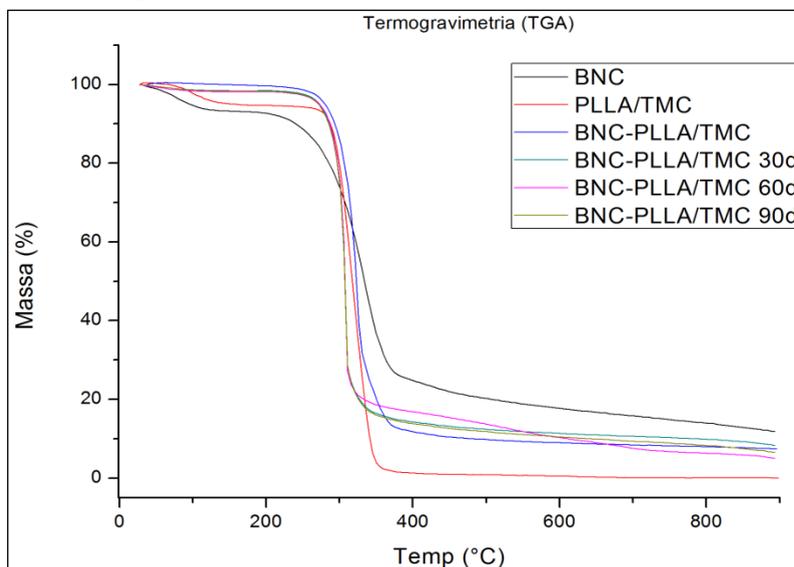
Fonte: elaborado pelo autor.

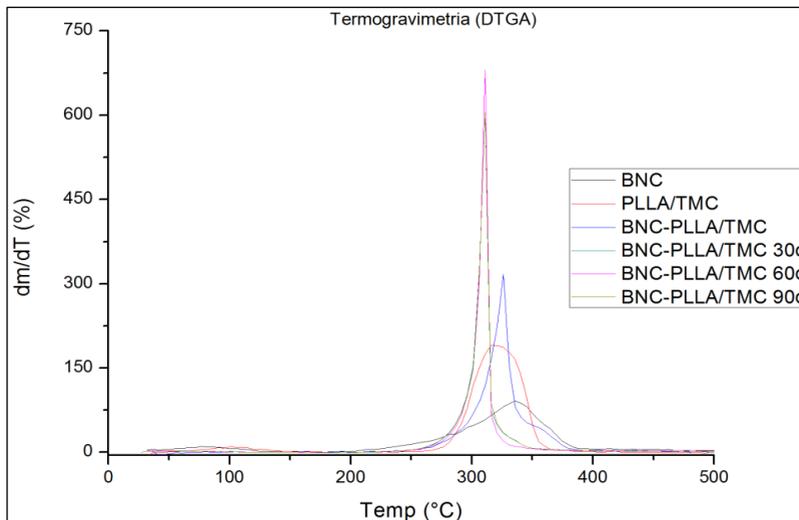
As análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) denotam a ocorrência de um pico correspondente aos grupos hidroxila (O-H), caracteristicamente presentes na estrutura química da BNC, ao redor de 3300 cm^{-1} , bem como o estiramento C-O com pico logo acima de 1000 cm^{-1} . Em contrapartida, as análises relacionadas aos compósitos poliméricos de BNC-PLLA/TMC, evidenciam transmitância em comprimentos de onda com picos em 1750 cm^{-1} , correspondente ao grupo carbonila (C=O), picos em 1250 cm^{-1} correspondendo ao grupo funcional éter (C-O-C) e em 3000 cm^{-1} correspondendo à ligação C-H (hidrocarbonetos). Estes achados são compatíveis com os encontrados por Dong *et al.* (2014b) que estudaram várias blendas poliméricas com potencial para confecção de *stents* coronarianos absorvíveis, incluindo uma composição de PLLA/TMC, na razão molar 75/25 m/m. Nota-se ainda que, residualmente, não se observaram picos característicos do clorofórmio, denotando que houve evaporação total do solvente.

4.2.4 TERMOGRAVIMETRIA

O comportamento térmico das membranas de BNC, blendas de PLLA/TMC e compósitos de BNC-PLLA/TMC originais e expostos a uma solução de PBS + azida 0,02% por 30, 60 e 90 dias foi estudado através de termogravimetria. A Figura 25 apresenta as curvas de TGA e DTGA (derivada das curvas termogravimétricas) obtidas.

Figura 25 – Curvas termogravimétricas (TGA e DTGA) representando as variações das massas de membranas de BNC, de blendas de PLLA/TMC e dos compósitos de BNC-PLLA/TMC expostos ao PBS por 30, 60 e 90 dias em função de temperaturas crescentes.





Fonte: elaborado pelo autor.

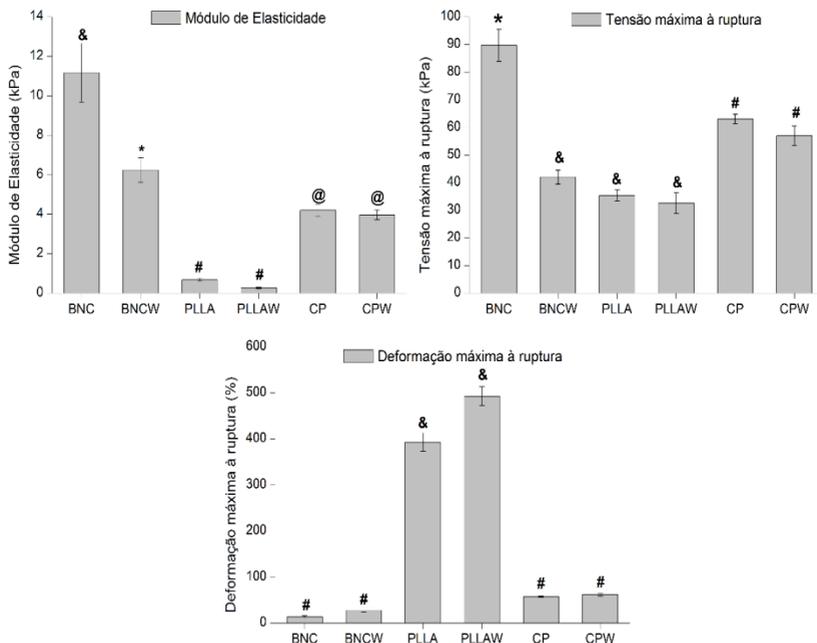
As curvas para a BNC mostram 3 fases distintas: uma inicial, dos 80°C aos 100°C, correspondendo à perda de massa relacionada com a vaporização da água contida nas membranas; uma segunda fase, caracterizada pela rápida perda de massa, indicando que ocorreu degradação do material (temperatura de degradação (T_d)) em 335°C e uma terceira fase corresponde à lenta perda de massa, que a partir dos 390°C decai lentamente para 15% da massa inicial nos 800°C, sendo compatível com os resíduos de carbono da amostra. Estes resultados são comparáveis àqueles obtidos por outros autores, que encontraram uma temperatura de degradação para a BNC de 350°C, 360°C, 355°C e 343°C, respectivamente (GEORGE et al., 2005; GOLDSCHMIDT et al., 2016; HU; CATCHMARK, 2011; STUMPF et al., 2013). As blendas de PLLA/TMC e os respectivos compósitos também originaram curvas termogravimétricas trifásicas. A despeito de pequena perda inicial de massa verificada na blenda PLLA/TMC, os compósitos apresentaram perda de massa desprezível nesta fase. Durante a fase de rápida perda de massa, os picos observados nas curvas de DTGA em 318°C e 325°C correspondem às temperaturas de degradação (T_d) para a blenda PLLA/TMC e o compósito de BNC-PLLA/TMC respectivamente, enquanto que a T_d encontrada para os compósitos expostos ao PBS por 30, 60 e 90 dias esteve ao redor dos 311°C. As análises das temperaturas de degradação, sugerem que a adição da BNC ao

PLLA/TMC confere maior estabilidade térmica à blenda, indicando uma íntima relação entre as fases dos 2 biomateriais. No entanto, este efeito é parcialmente revertido nos compósitos expostos ao PBS. Isto poderia ser explicado pelo fato de que, ao serem expostos à solução de PBS, os compósitos, mesmo com perda de massa molar insignificante em 90 dias, sofrem mudanças de cristalinidade que podem alterar suas performances térmicas (DARGAVILLE et al., 2011; DONG et al., 2014b; HU; CATCHMARK, 2011; LEE; BLAKER; BISMARCK, 2009). Lee et al. (2009) estudaram o comportamento térmico de amostras de PLLA puras e compósitos combinando PLLA e nanofibrilas de BNC, através da técnica da separação de fase induzida termicamente. Os compósitos resultantes demonstraram maior estabilidade térmica que as lâminas de PLLA originais.

4.2.5 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Amostras de membranas de BNC, blendas de PLLA/TMC e compósitos de BNC-PLLA/TMC, secos e úmidos, foram testados quanto às suas principais propriedades mecânicas: módulo de elasticidade (módulo de Young), tensão máxima à ruptura e deformação máxima à ruptura. Os resultados destas análises estão representados na Figura 26.

Figura 26 – Performance mecânica de amostras secas e úmidas de BNC, PLLA/TMC e compósitos de BNC-PLLA/TMC. BNCW, PLLAW, CPW indicam membranas de BNC, PLLA/TMC e compósitos de BNC-PLLA/TMC úmidas, respectivamente. Símbolos iguais denotam performances sem diferença estatística para $p < 0,05$.



Fonte: elaborado pelo autor.

Dentre todos os biomateriais secos testados, as blendas de PLLA/TMC apresentaram os menores módulos de elasticidade (0,71 kPa) e tensão máxima à ruptura (35 kPa), porém foram os materiais mais flexíveis, alcançando deformações ao redor de 400% antes da ruptura. A BNC se demonstrou como o material com o maior módulo de elasticidade (11 kPa) e resistência tênsil (90 kPa), mas com o menor alongamento antes da ruptura (13%). Os compósitos de BNC-PLLA/TMC apresentaram desempenho intermediário entre as membranas de BNC e PLLA/TMC isoladas, com módulo de elasticidade, tensão máxima à ruptura e deformação máxima à ruptura de 4 kPa, 63 kPa e 57%, valores estes mais próximos aos valores obtidos para as membranas de BNC. Quando umedecidos em PBS a 37°C por 12 h, as membranas de BNC apresentaram diminuição dos seus módulos de elasticidade, enquanto que as blendas de PLLA/TMC e os

compósitos apresentaram a mesma performance para o intervalo de confiança $p < 0,05$. A resistência tênsil máxima antes da ruptura diminuiu de maneira significativa somente nas membranas de BNC, enquanto que a deformação máxima à ruptura não se alterou de maneira significativa para nenhum dos 3 biomateriais testados ($p < 0,05$).

Dargaville et al. (2011), estudaram blendas de PLLA/TMC com diferentes frações molares de TMC, tendo encontrado, para o PLLA/TMC (razão molar 58/42) módulo de Young de 3.8 MPa, em ambiente a 18°C e 1,7 MPa quando as amostras foram testadas em água a 37°C. Pêgo et al. (2003), ao estudar uma blenda de PDLLA/TMC, na razão molar 50/50, verificaram módulo de Young de 16 MPa para testes realizados em amostras secas. Ao avaliar a performance mecânica de membranas de BNC, Hu et al. (2011) encontraram módulo de elasticidade de 20,8 GPa e resistência à tração de 357,3 MPa para amostras puras de BNC, enquanto que, quando adicionadas de polianilina (um biopolímero eletrocondutor), o módulo de elasticidade decresceu para 5,6 GPa e a resistência a tração para 95,7 MPa. Lee et al. (2009) estudaram nanocompósitos de PLLA e BNC, com a celulose sendo previamente tratada com ácidos orgânicos e depois homogeneizada com PLLA através de separação de fase induzida termicamente. Os autores demonstram que a adição de BNC ao PLLA, naquelas condições, aumentou os módulos de elasticidade de 1,34 GPa para 1,98 GPa e a resistência tênsil de 60,7 MPa para 68,5 MPa comparando as membranas de PLLA e BNC/PLLA, respectivamente. No mesmo estudo, foi demonstrado uma diminuição na deformação à ruptura de 3,6% a 2,7% na comparação entre o PLLA e os compósitos de BNC/PLLA respectivamente. Outros autores demonstraram um aumento na resistência tênsil e módulo de elasticidade de 203% e 146% em compósitos de BNC/PLLA em comparação ao PLLA isolado (KIM et al., 2009).

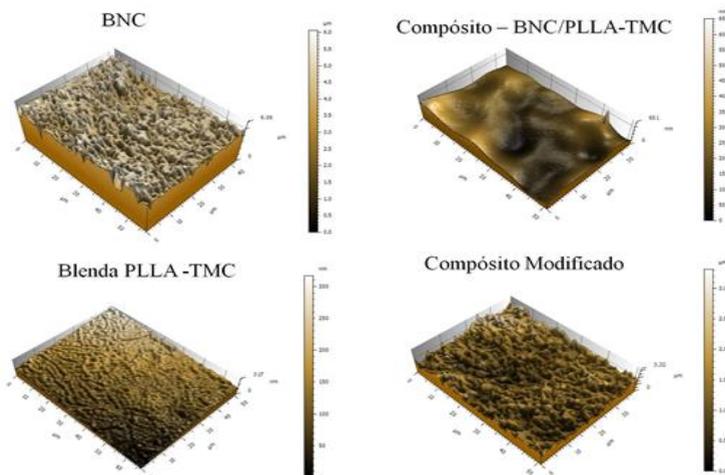
Em comparação como os dados da literatura, encontramos valores absolutos de módulos de elasticidade e resistência tênsil consideravelmente mais baixos que os descritos. Esta ampla variação se deve, possivelmente, a variações na densidade, cristalinidade e geometria de materiais tidos como similares, bem como à variabilidade de condições de testes e equipamentos adotados. Godinho et al. (2016), ao estudar a incorporação de extratos de *Aloe vera* às membranas de BNC (elaborada a partir de cepas de *G. hansenii*), obteve valores de módulo de elasticidade e tensão máxima à ruptura de 26,9 kPa e 480 kPa respectivamente, valores estes mais próximos aos valores verificados no presente estudo. Kim et al. (2009) combinaram a BNC

ao PLLA, resultando em um compósito resistente e homogêneo, porém rígido, devido ao componente PLLA. Esta associação não se constitui em uma solução que atenda à demanda de implantação junto a medula espinhal fetal circundada pelo líquido amniótico, pois o compósito poderia causar compressão junto ao tecido medular e, ao mesmo tempo, se soltar dos tecidos aos quais ele seria ancorado, provocando fistulas liquóricas. Tão importante quanto a determinação dos parâmetros para cada biomaterial isoladamente, as análises de performance mecânica permitiram verificar que a combinação de BNC e PLLA/TMC originou um compósito de características mecânicas intermediárias entre os dois polímeros, resistente e ao mesmo tempo flexível, resultados estes favoráveis para aplicações cirúrgicas que envolvam a reparação de amplos defeitos cutâneos (DARGAVILLE et al., 2011).

4.2.6 PERFILOMETRIA

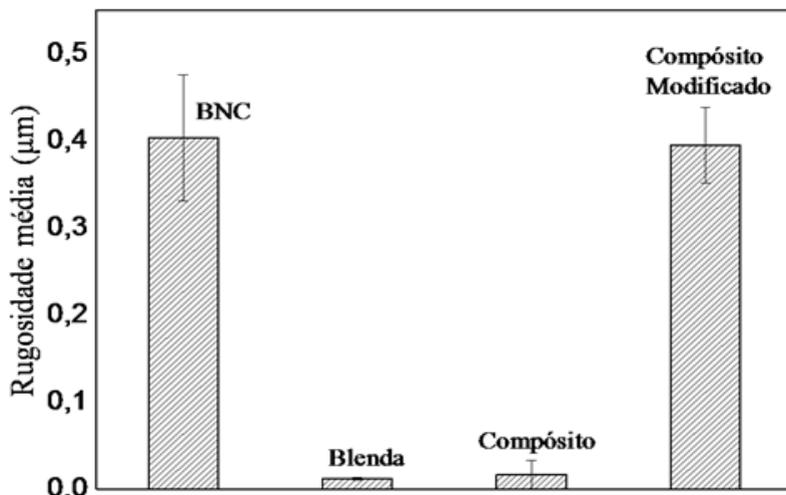
A análise de perfilometria foi aplicada para determinação da rugosidade de superfície das amostras de nanocelulose bacteriana (BNC), da blenda de PLLA/TMC, do compósito de BNC-PLLA/TMC (CP) e do compósito modificado de BNC-PLLA/TMC (CPMOD). A Figura 27 demonstra as imagens de superfície dos materiais analisados, enquanto que a Figura 28 representa os valores de rugosidade média para cada um dos materiais.

Figura 27 – Aspecto de rugosidade de superfície de amostras de BNC, PLLA/TMC, compósitos de BNC-PLLA/TMC originais e compósitos de BNC-PLLA/TMC modificados.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 28 - Rugosidade média da superfície de amostras de BNC, blenda de PLLA/TMC, compósitos de BNC-PLLA/TMC originais (compósito) e compósitos de BNC-PLLA/TMC modificados (compósito modificado).



Fonte: elaborado pelo autor.

Pode-se observar na Figura 27, que a rugosidade da superfície do compósito de BNC-PLLA/TMC é distinta daquela encontrada nas membranas de celulose nanocelulose bacteriana (BNC). No entanto, observa-se que a superfície do compósito apresenta similaridade com a superfície da blenda de PLLA-TMC, evidenciando uma camada delgada e ondulada na superfície do compósito. Já no compósito modificado, pode-se observar um comportamento mais próximo à superfície da BNC, indicando que ocorreu a remoção da blenda na superfície do compósito através da modificação química.

A quantificação das rugosidades médias (Figura 28) revela que a BNC apresenta uma rugosidade média de $0,403 \pm 0,072 \mu\text{m}$ e quando a BNC é impregnada com a blenda PLLA-TMC, a mesma passa a apresentar uma rugosidade média de $0,016 \pm 0,016 \mu\text{m}$, resultado muito similar quando comparado com a blenda pura, com rugosidade média de $0,012 \pm 0,001 \mu\text{m}$. Já o compósito modificado apresentou uma rugosidade média de $0,394 \pm 0,043 \mu\text{m}$, resultado que se assemelha ao da BNC.

O grau de rugosidade de superfície dos materiais é um importante fator na promoção de adesão celular, sendo que, genericamente, quanto maior o seu grau, mais facilmente as células se aderem ao material (KUNZLER et al., 2007; PRASAD et al., 2015; RIMPELOVÁ et al., 2014; ROCHA et al., 2014; SMITH et al., 2009). Superfícies muito uniformes e lisas, com baixo índice de rugosidade, tendem a dificultar a adesão celular (BERTI et al., 2013; ISHIZAKI; SAITO; TAKAI, 2010) enquanto que em algumas combinações material-célula, graus de rugosidade mais baixos podem favorecer a adesão celular (FAN et al., 2002; KUNZLER et al., 2007). Existe considerável variabilidade das medidas da rugosidade, dadas as variações de materiais e condições topográficas (FAN et al., 2002; PRASAD et al., 2015). Kunzler et al.(2007), demonstraram que índices de rugosidade crescentes (variando de $1,12 \mu\text{m}$ a $5,70 \mu\text{m}$), em um mesmo disco de alumínio recobertos por titânio, favoreceram a adesão de osteoblastos de calvária de ratos, enquanto que fibroblastos gengivais humanos aderiram mais facilmente nas superfícies de rugosidade menor. Outros autores modificaram a superfície de lâminas de PLLA/TMC (70/30%) através de técnica fotolitográfica, produzindo sulcos de largura e profundidade variáveis, sobre as quais cultivaram mioblastos C2C12 por 7 dias (ALTOMARE et al., 2010). A rugosidade de superfície variou de $0,60 \mu\text{m}$ a $5 \mu\text{m}$, enquanto que as larguras variaram de $5 \mu\text{m}$ a $100 \mu\text{m}$. Ao final dos 7 dias de cultivos, os autores

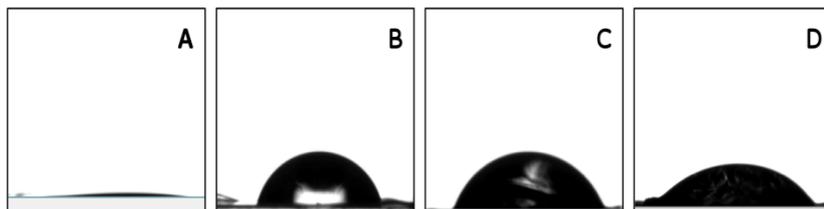
demonstraram que os mioblastos em questão aderiram e proliferaram de maneira eficaz junto a sulcos mais rasos e largos, medindo 1 μm de profundidade e 25 μm de largura.

Corroborando a conotação multifatorial na determinação da adesão celular junto a superfície dos materiais, Rocha et al. (2014), estudaram blendas de poli(trimetileno carbonato-co- ϵ -caprolactona)- (P(TMC-CL)), com potencial para o desenvolvimento de membranas bioeletroquímicas. Eles compararam tais blendas com os polímeros poli(trimetileno carbonato) (P(TMC)), e poli(ϵ -caprolactona) (P(CL)) quanto às suas rugosidades de superfície, encontrando rugosidades médias de 24 nm, 21 nm e 1.66 nm para o P(TMC-CL), o P(CL) e o P(TMC), respectivamente. Neurônios corticais de ratos emitiram prolongamentos axonais mais longos e polarizados quando cultivados sobre uma blenda de (P(TMC-CL)). Apesar de rugosidade semelhante, os autores verificaram que a blenda apresentava um grau de dureza e rigidez menores que o P(CL) isolado, o que explicaria os melhores resultados com as blendas estudadas (ROCHA et al., 2014).

4.2.7 MOLHABILIDADE DE SUPERFÍCIE

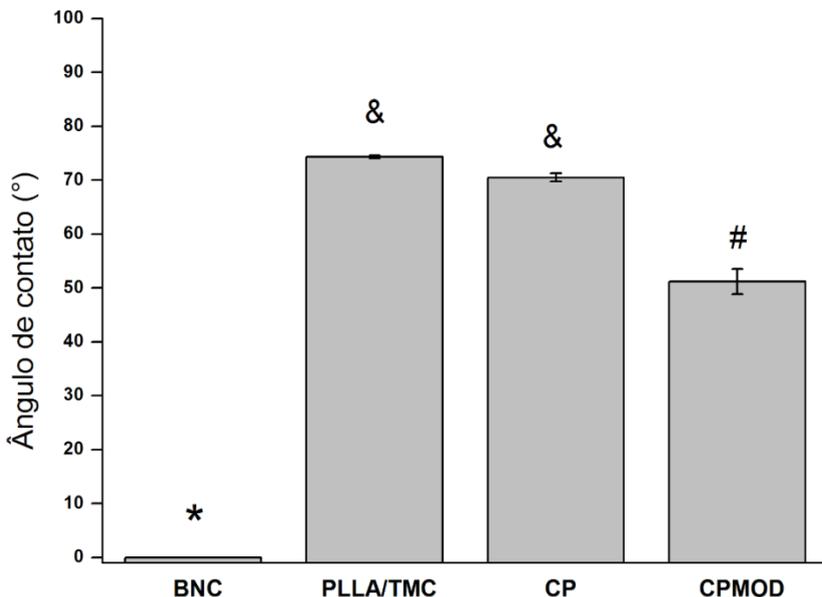
A Figura 29 demonstra fotografias de amostras representativas obtidas durante os testes de ângulos de contato para membranas de BNC, blendas de PLLA/TMC, compósitos originais (CP) e compósitos modificados (CPMOD), enquanto que na Figura 30 e na Tabela 5 são apresentadas as medidas dos ângulos de contato medidos para cada biomaterial testado.

Figura 29 – Fotografias obtidas durante os testes ângulo de contato. Em: A) membrana de BNC; B) blenda de PLLA/TMC; C) compósito de BNC-PLLA/TMC e D) compósito de BNC-PLLA/TMC modificado.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 30 – Representação gráfica dos valores de ângulo de contato mensurados a partir da superfície de membranas de BNC, blendas de PLLA/TMC, compósitos de BNC-PLLA/TMC e compósitos de BNC-PLLA/TMC modificados. Símbolos iguais representam medidas estatisticamente iguais para $p < 0,05$.



Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Medidas dos ângulos de contato de amostras de BNC, PLLA/TMC, CP e CPMOD. Símbolos iguais representam materiais com ângulo de contato iguais estatisticamente para $p < 0,05$.

	BNC ^(*)	PLLA/TMC ^(&)	CP ^(&)	CPMOD ^(#)
Ângulo de contato (°)	-	74,36° (± 0,37)	70,5° (± 1,63)	51,23° (± 5,12)

Fonte: elaborado pelo autor.

A celulose bacteriana (BNC) foi testada pelo teste do ângulo de contato, mas, devido a sua hidrofiliabilidade e porosidade, a gota d'água foi imediata e completamente absorvida pelo material nas 3 amostras estudadas. Para os outros materiais foi possível a obtenção dos ângulos de contato em todas as amostras, obtendo-se 74,36° (± 0,37), 70,5° (± 1,63) e 51,23° (± 5,12) para o PLLA/TMC, compósitos de BNC-

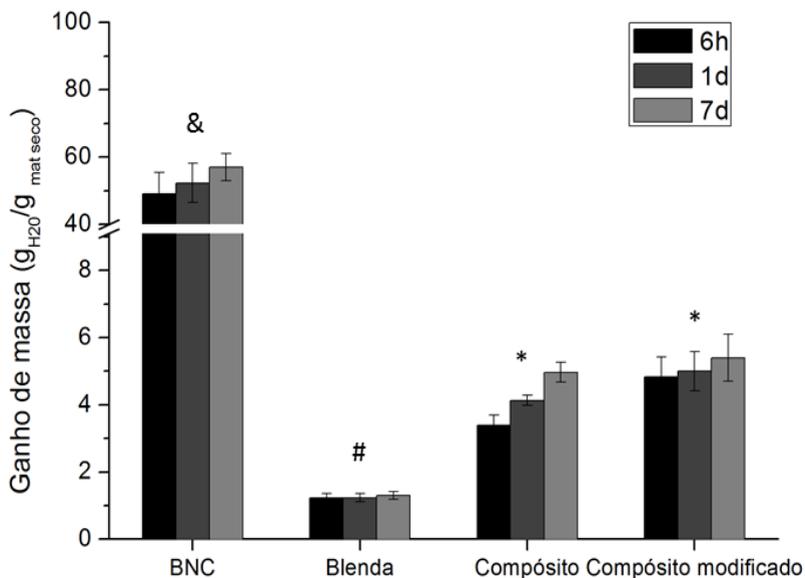
PLLA/TMC originais e compósitos BNC-PLLA/TMC modificados, respectivamente. Estes achados corroboram dados de literatura, com a descrição de um ângulo de contato de 75° para o PLLA/TMC (Resomer[®]LT 706, Alemanha), idêntico ao utilizado no presente trabalho (Neuss 2011 et al). Em outro trabalho, Dong et al. (2014) ao testar variações de blendas poliméricas com potencial para a confecção de *stents* cardíacos, incluindo PLLA, PTMC, PLLA/TMC e PLLA/TMC+ PGA, encontraram uma medição de $80,6^\circ$ para o ângulo de contato de uma blenda de PLLA/TMC na razão de fração molar de 75/25, enquanto que Yang et al. (2010) obtiveram um ângulo de contato de $80,1^\circ$ para o PLLA/TMC de razão molar 50/50. No presente estudo, os compósitos de BNC-PLLA/TMC mantiveram essencialmente o mesmo grau de molhabilidade que as blendas de PLLA/TMC, mas os compósitos, quando modificados em uma das suas superfícies pelo afilamento da camada superior da blenda PLLA/TMC, apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) dos ângulos de contato medidos, o que denota aumento da hidrofiliabilidade das superfícies testadas.

Embora exista marcada variabilidade entre as descrições das melhores condições de molhabilidade que favoreçam a adesão e proliferação celular, Saltzman e Kyriakides. (2014), ao compilar dados de diversas combinações entre polímeros e células, relatam que condições intermediários de molhabilidade, isto é, com ângulos de contato dentre 70° e 80° , estão associadas com maior adsorção proteica e proliferação celular. Em trabalho recente, Rimpelová et al. (2014) estudaram a adesão e proliferação de fibroblastos e queratinócitos humanos em membranas de PLLA, cujas superfícies foram modificadas através do tratamento com plasma argônio. Os autores correlacionaram as modificações de superfície com aumento da rugosidade e hidrofiliabilidade, e o consequente aumento da adesão e proliferação celular nas condições daquele estudo. Outros autores modificaram a superfície de compósitos de PLGA através de ataque cáustico com NaOH 0,1N, o que ocasionou uma diminuição do ângulo de contato em comparação com o polímero original, tornando a superfície mais hidrofílica e mais favorável a adesão e proliferação de fibroblastos humanos e HaCaT (SADEGHI et al., 2016). Os autores, neste trabalho, argumentam que o ataque químico imposto pela solução cáustica foi capaz de expor radicais carboxila e hidroxila na superfície das membranas, tornando-as mais hidrofílicas e propensas a ligações com outras macromoléculas, como o colágeno.

4.2.8 CAPACIDADE DE HIDRATAÇÃO

A Figura 31 apresenta os ganhos de massa dos 4 biomateriais testados após imersão em solução de PBS + azida 0,02% durante 6 h, 1 e 7 dias.

Figura 31 – Ganhos de massa das membranas de BNC, blendas de PLLA/TMC, compósitos de BNC-PLLA/TMC originais e compósitos modificados.



Fonte: elaborado pelo autor.

As análises demonstram que as membranas de BNC acumularam a maior quantidade de H₂O em relação às massas secas já em 6 h após o início dos ensaios, enquanto que as blendas de PLLA/TMC apresentaram os menores ganhos de massa ao longo dos 7 dias. Os compósitos originais e modificados retiveram mais água do que as blendas de PLLA/TMC, porém não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ($p < 0,05$).

A capacidade de hidratação expressa a hidrofilicidade dos biomateriais, sendo influenciada pela constituição química, topografia e degradação dos mesmos (GODINHO et al., 2016; SMITH et al., 2009). Godinho et al. (2016) relataram ganho de massa de 90 vezes em 24 h

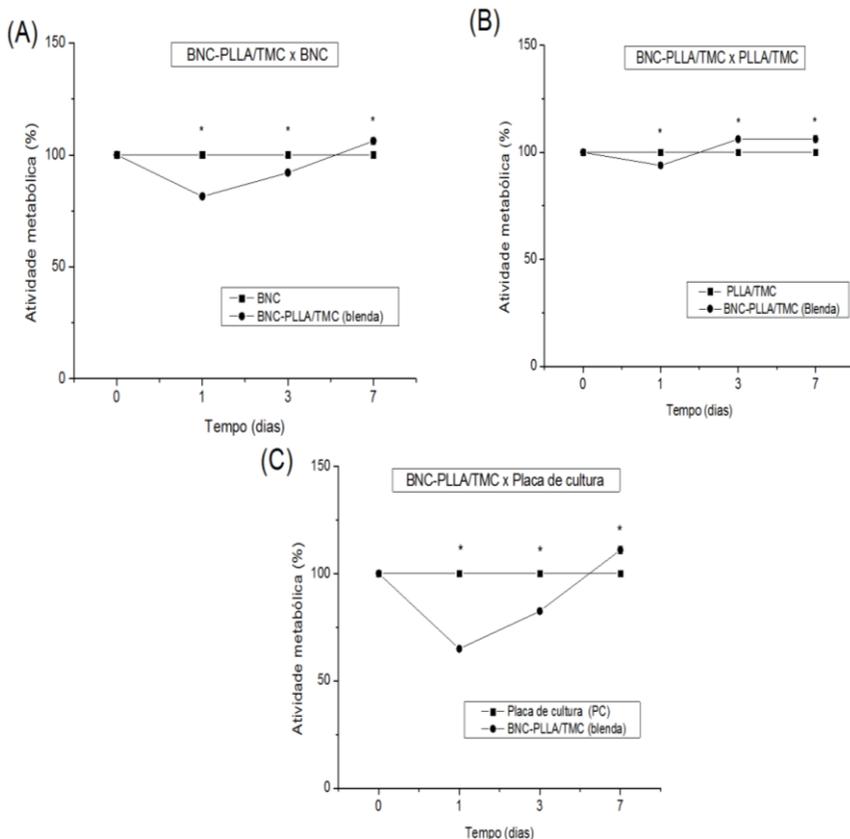
para amostras de BNC produzidas com a *G. hansenii*, em comparação com o ganho de 50 vezes verificado nos presentes ensaios. A adição de TMC torna as blendas mais hidrofóbicas, o que diminui a capacidade de absorção d'água e retarda a degradação por hidrólise, corroborando os achados de diminutos ganhos de massa das blendas de PLLA/TMC em 7 dias no presente estudo (DARGAVILLE et al., 2011). Ambos os compósitos de BNC-PLLA/TMC, originais e modificados, aumentaram suas massas ao redor de 5 vezes ao final dos 7 dias, indicando uma menor hidrofobicidade quando em comparação com as blendas de PLLA/TMC puras, o que é compatível com outros relatos de copolimerização e elaboração de compósitos (DARGAVILLE et al., 2011; FUKUSHIMA, 2015; PRASAD et al., 2015).

4.3 ENSAIOS *IN VITRO*

4.3.1 ATIVIDADE METABÓLICA DE FIBROBLASTOS L929 EM CONTATO DIRETO COM COMPÓSITOS DE BNC-PLLA/TMC – QUANTIFICAÇÃO PELO MTS

A Figura 32 mostra, em percentual relativo, o efeito das amostras de BNC, PLLA/TMC e BNC-PLLA/TMC na atividade metabólica de fibroblastos L929 cultivados *in vitro*.

Figura 32 - Atividade metabólica de fibroblastos L929 cultivados em contato direto com as amostras de BNC, PLLA/TMC e BNC-PLLA/TMC. A) BNC-PLLA/TMC versus BNC; B) BNC-PLLA/TMC versus PLLA/TMC) e C) BNC-PLLA/TMC versus placa de cultura.



* Estatisticamente significante para $p < 0,05$

Fonte: elaborado pelo autor.

Ao final dos 7 dias de cultura das células L929 em contato direto com a blenda BNC-PLLA/TMC em comparação à BNC, ao PLLA/TMC e às células cultivadas na placa de cultura (PC), houve diferenças significativas no percentual de atividade metabólica em todos os tempos experimentais, porém, sem caracterizar citotoxicidade, de acordo com a ISO 10993-5 (DE JONG; CARRAWAY; GEERTSMA, 2012). A Figura 32A demonstra o percentual de atividade metabólica dos fibroblastos

L929 expostos às blendas BNC-PLLA/TMC em comparação com ao grupo exposto à BNC. Neste caso houve diminuição da atividade metabólica de 18% ($\pm 1,2$) no primeiro dia, diminuição de 8% ($\pm 0,7$) no terceiro e aumento de 6% ($\pm 1,6$) no sétimo dia de observações experimentais. Na Figura 32B, observa-se o comportamento da atividade metabólica celular comparativamente entre as células expostas às blendas BNC-PLLA/TMC e ao PLLA/TMC isolado. Pode-se observar que há diminuição da atividade metabólica celular de 6,2% ($\pm 1,3$) no primeiro dia, aumento de 6,2% ($\pm 0,8$) no terceiro e novo aumento de 6,1% ($\pm 1,6$) no sétimo dia de cultivo. A Figura 32C mostra a evolução da atividade metabólica das células L929 quando cultivadas com as blendas BNC-PLLA/TMC em comparação com as células cultivadas na placa de cultura (PC). Nesta comparação, a atividade metabólica das células cultivadas em contato direto com a blenda BNC-PLLA/TMC diminuiu 35% ($\pm 0,9$) no primeiro e 17% ($\pm 0,6$) no terceiro dia de cultivo, mas aumentou substancialmente 11% ($\pm 1,7$) no sétimo dia de cultivo. Diferenças estatísticas também foram observadas quando se compara a atividade metabólica das células L929 cultivadas na placa de cultura e em contato direto com as amostras de BNC e PLLA/TMC (dados não mostrados). Apesar de detectadas diferenças significativas, comparativamente, a atividade metabólica das células cultivadas na placa de cultura e/ou em contato direto com os materiais (BNC, PLLA/TMC e BNC-PLLA/TMC), os resultados mostram que a redução na atividade metabólica celular não foi superior a 30% ao longo dos 7 dias de experimento como regulamenta a ISO 10993-5. Desta forma, evidencia-se que a BNC, o PLLA/TMC e a blenda BNC-PLLA/TMC não influenciaram de forma citotóxica a atividade metabólica das células L929 *in vitro* neste estudo.

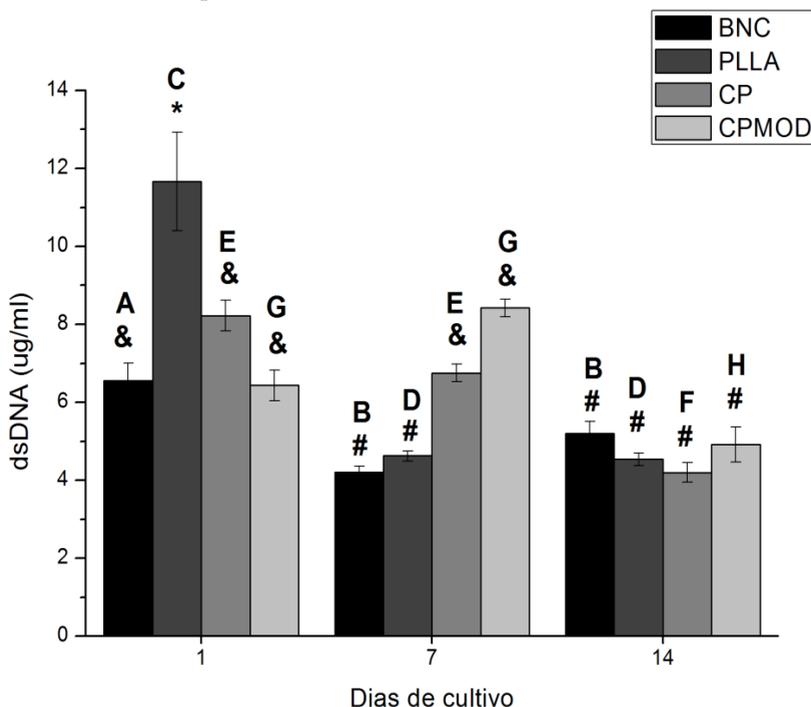
Os resultados apresentados na Figura 22 corroboram com outros trabalhos da literatura que mostram ausência de citotoxicidade induzida pelas blendas de PLLA/TMC (DARGAVILLE et al., 2011; JI et al., 2010; ROCHA et al., 2014). Dargaville et al. (2011) analisaram a citotoxicidade de diferentes frações molares de PLLA/TMC (70/30 m/m e 30/70 m/m) em culturas de células tronco mesenquimais humanas e os resultados obtidos mostraram que os materiais produzidos não foram citotóxicos às células tronco humanas em nenhuma das frações molares testadas. Em outro estudo de validação do uso de PLLA/TMC bioabsorvível, como *stent* coronariano, extratos das amostras de PLLA/TMC (50/50 m/m) foram testados através do método de contato indireto em cultura de células endoteliais e nenhuma influência na atividade metabólica destas células foi observada (YANG

et al., 2010). Messias et al. (2014) demonstraram a compatibilidade de matrizes de PLDLA (L-co-D,L-ácido láctico) em contato com osteoblastos humanos SaOS-2. Além dos referidos estudos, que apontam ausência de citotoxicidade do PLLA/TMC *in vitro*, estudos *in vivo* demonstraram histocompatibilidade deste material e suas variantes, como o PDLLA/TMC (poli(D,L-ácido láctico-co-trimetileno carbonato)) quando em contato com o tecido celular subcutâneo dorsal de ratos (GUO et al., 2011) e PTMC (poli(trimetileno carbonato)), como enxertia óssea em mandíbulas de ratos (VAN LEEUWEN et al., 2012). Os resultados obtidos neste trabalho mostram, de acordo com a ISO 10993-5, que a blenda BNC-PLLA/TMC não alterou a atividade metabólica das células L929, corroborando com os outros ensaios previamente relatados na literatura.

4.3.2 ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCat)

Queratinócitos humanos de linhagem imortalizada (HaCaT), foram cultivados durante 14 dias sobre amostras de membranas de BNC, blendas de PLLA/TMC, compósitos de BNC-PLLA/TMC e compósitos de BNC-PLLA/TMC modificados. Na Figura 33 estão representadas as concentrações de dsDNA, determinadas pela técnica do PicoGreen[®], relativas às células cultivadas sobre os 4 biomateriais.

Figura 33 – Concentração de dsDNA em células HaCaT, estimada pela técnica do Pico Green®, cultivadas sobre BNC, PLLA/TMC, compósitos de BNC-PLLA/TMC e compósitos modificados de BNC-PLLA/TMC após 1, 7 e 14 dias de cultura. As letras iguais sobre as barras indicam concentrações semelhantes de cada material ao longo dos dias e os símbolos iguais representam semelhança entre os grupos quando comparados entre si para cada dia de cultura em separado ($p < 0,05$). Letras iguais indicam concentrações semelhantes entre os mesmos biomateriais ao longo dos dias BNC (A e B), PLLA/TMC (C e D), BNC-PLLA/TMC (E e F) e BNC- PLLA/TMC modificados (G e H). Símbolos iguais indicam concentrações semelhantes entre os diferentes materiais a cada dia de análise em separado.



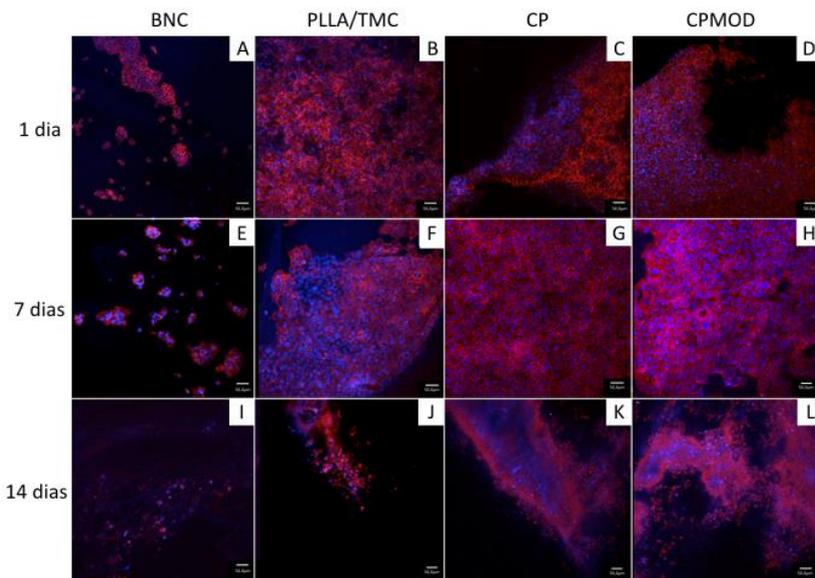
Fonte: elaborado pelo autor.

As concentrações de DNA de células HaCaT cultivadas sobre os 4 biomateriais, obtidas através da técnica PicoGreen®, demonstram que, ao final de 24h de cultura, houve maior concentração de DNA no grupo das blendas de PLLA/TMC ($p < 0,05$), enquanto que as células proliferaram de maneira equivalente sobre os outros biomateriais no mesmo espaço de tempo ($p > 0,05$). Após 7 dias de cultura, obteve-se maior concentração de DNA nos grupos dos compósitos originais e

modificados em comparação com as células junto às membranas de BNC e blendas de PLLA/TMC ($p < 0,05$). Evolutivamente, os grupos BNC e PLLA/TMC apresentaram uma diminuição da concentração de DNA do primeiro ao 7º dia de cultivo celular ($p < 0,05$), enquanto que para os grupos CP e CPMOD as concentrações de DNA não mudaram significativamente ($p > 0,05$). Com as análises estendidas ao 14º dia, todos os 4 grupos apresentaram concentrações semelhantes de DNA entre si neste período ($p < 0,05$). No entanto, do 7º dia ao 14º dia, os grupos BNC e PLLA/TMC mantiveram seus níveis de DNA estáveis enquanto que os grupos CP e CPMOD tiveram suas concentrações de DNA significativamente diminuídas ($p < 0,05$).

A Figura 34 mostra imagens de microscopia confocal de queratinócitos humanos (HaCat) cultivados sobre os 4 biomateriais, corados pela técnica Dapi-Faloidina, e analisados em 1, 7 e 14 dias.

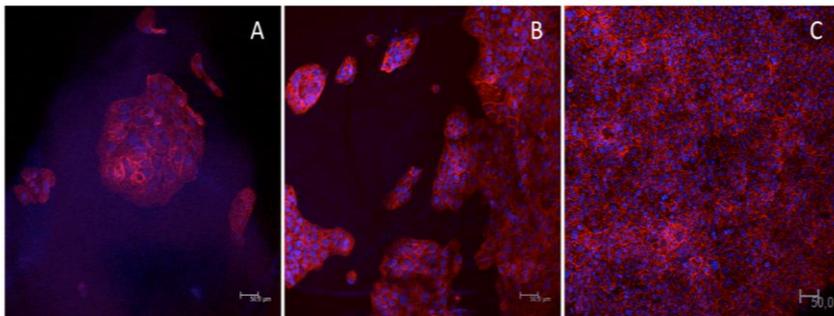
Figura 34 – Micrografias obtidas pela técnica confocal de queratinócitos humanos (HaCaT) cultivados sobre os 4 biomateriais por 1, 7 e 14 dias. Membranas de nanocelulose bacteriana (A, E e I), blendas de PLLA/TMC (B, F e J), compósitos de BNC-PLLA/TMC (C, G e K) e compósitos de BNC-PLLA/TMC modificados (D, H e L). Micrografias obtidas pela técnica confocal com aumento de 200X, após aplicação dos corantes DAPI e Faloidina. Barras representativas de 50 μm .



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

As análises com aumentos de 200 vezes, demonstram que os queratinócitos aderiram sobre todos os biomateriais após 24 h de cultura. Dois padrões de adesão foram identificados: o predominante, caracterizado pela formação de amplos segmentos de células relacionadas entre si e aderidas sobre áreas das membranas de PLLA/TMC, compósitos originais e porções mais periféricas dos compósitos modificados; e outro, mais restrito às membranas de BNC e porções centrais dos compósitos modificados, caracterizado por uma disposição de células aglutinadas em pequeno número, mas com uma distribuição mais difusa sobre as superfícies mencionadas. Como também se observa nas Figuras 34C e 34D, as células aderiram aos materiais acompanhando as irregularidades do relevo de superfície de cada biomaterial. Os queratinócitos cultivados sobre as membranas de BNC, como comentado anteriormente, apresentaram uma distribuição insular de adesão celular formando aglutinados celulares, distribuídos pela superfície das membranas, em todos os 3 tempos de análise (Figuras 34A, 34E e 34I). As análises de sétimo dia mantém, essencialmente, as mesmas características de adesão como ao primeiro dia, com os queratinócitos distribuídos em pequenos grupamentos nas membranas de BNC (Figura 34E), e formando áreas mais extensas de células aderidas sobre os outros materiais (Figuras 34F, 34G e 34H). Entretanto, ao final dos 14 dias de cultura, observa-se uma nítida diminuição na densidade celular nas membranas de PLLA/TMC, CP e CPMOD (Figuras 34J, 34K e 34L) respectivamente. A Figura 34I demonstra persistência do mesmo padrão de distribuição celular para os queratinócitos aderidos à BNC após 14 dias. Esta apresentação de adesão em pequenas ilhotas foi também verificada nas áreas mais centrais dos compósitos modificados, como demonstrado na Figura 35.

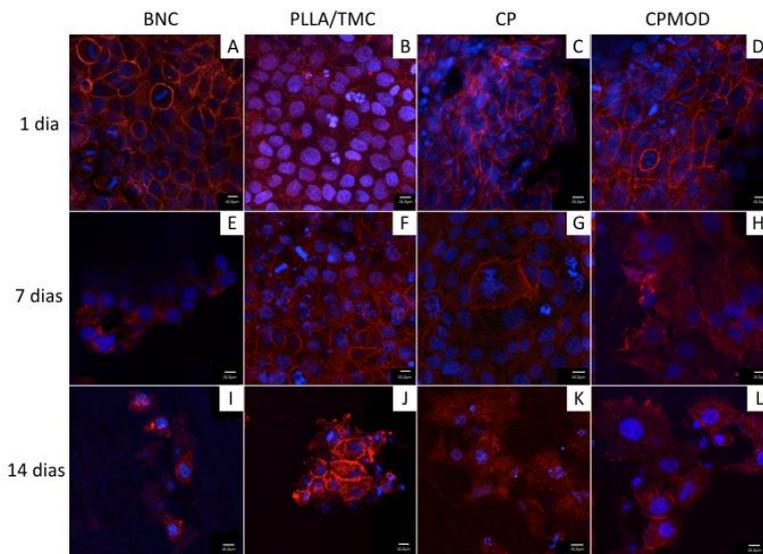
Figura 35– Micrografias obtidas por técnica confocal delineando o padrão de adesão celular nos compósitos modificados nas suas porções centrais e periféricas. Em: A) aspecto da distribuição dos grupamentos celulares ao centro dos compósitos modificados; B) transição entre o padrão de adesão insular (metade esquerda da figura) e adesão formando uma camada mais ampla de células aderidas (metade direita da figura); C) área de alta densidade celular formando uma camada compacta de queratinócitos aderidos. Aumentos de 200X, coloração com Faloidina (vermelho) e DAPI (azul), as barras horizontais representam 50 μm .



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A Figura 36 apresenta as micrografias obtidas pela técnica confocal com aumento de 1000 vezes, demonstrando os queratinócitos HaCaT aderidos sobre os 4 biomateriais.

Figura 36 – Micrografias obtidas pela técnica confocal de queratinócitos humanos (HaCaT) cultivados sobre os 4 biomateriais por 1, 7 e 14 dias. Membranas de nanocelulose bacteriana (figuras A, E e I), blends de PLLA/TMC (figuras B, F e J), compósitos de BNC-PLLA/TMC (figuras C, G e K) e compósitos de BNC-PLLA/TMC modificados (figuras D, H e L). Micrografias obtidas pela técnica confocal com aumento de 1000 vezes, após aplicação dos corantes DAPI e Faloidina. Barras representativas de 10 μ m.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

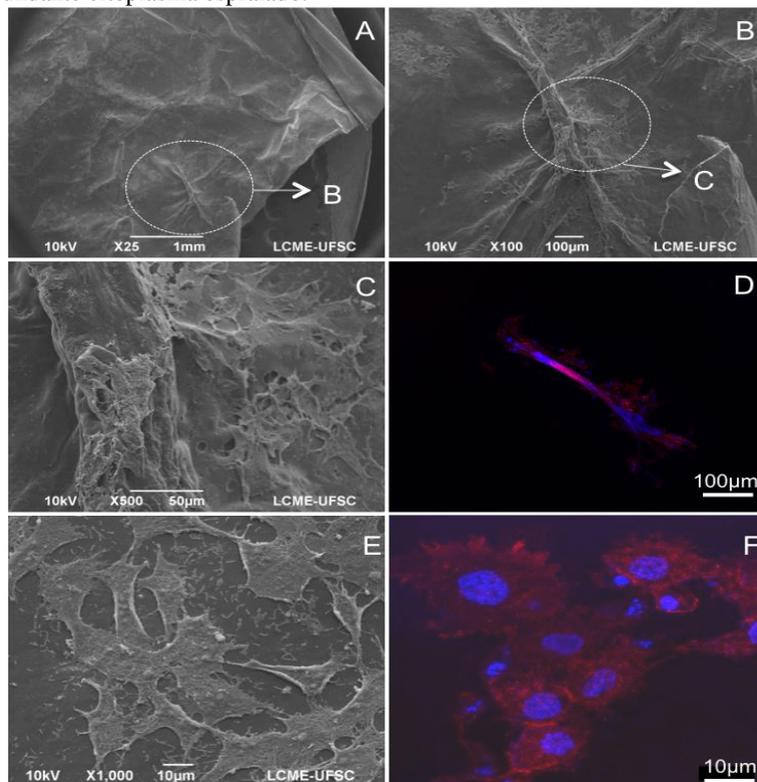
As imagens da figura 36 demonstram detalhes morfológicos das células aderidas aos 4 biomateriais nos 3 tempos de estudo. As análises de primeiro dia de cultivo demonstram um padrão de células mais arredondado para os grupos da BNC e PLLA/TMC, enquanto que nos grupos CP e CPMOD as células analisadas apresentavam-se mais alongadas, assumindo morfologias por vezes bastante irregulares. Nota-se, nas 4 amostras, áreas de condensações nucleares em algumas células, bem como alguns exemplos de fragmentação nuclear em alguns queratinócitos em contato com o PLLA/TMC (Figura 36B). Ao sétimo dia de cultivo, os queratinócitos sobre as membranas de BNC mantiveram formatos arredondados, enquanto que para os outros 3 grupos as células adquiriram um formato mais espreado e com citoplasma mais proeminente. São notadas áreas de condensação nuclear

mais evidentes nos queratinócitos cultivados sobre as lâminas de PLLA/TMC (Figura 36F). Aos 14 dias, os queratinócitos expressaram uma morfologia de espreadimento e abundância citoplasmática em todos os grupos, porém de maneira mais marcada nos grupos CP e CPMOD (Figuras 36I, 36J, 36K e 36L).

Com o intuito de correlacionar os padrões duais de adesão celular encontrados na microscopia confocal dos compósitos no grupo CPMOD com a morfologia de superfície, membranas do grupo CPMOD foram posteriormente analisadas por MEV. Para este fim, os materiais, após as análises de microscopia confocal, foram preparados pela técnica do HMDS (hexametildisilazano) como descrito anteriormente.

A Figura 37 denota os achados de MEV em correlação com os dados de análise por técnica confocal para a amostra de um compósito de BNC-PLLA/TMC modificado semeado por células HaCaT após 14 dias de cultura.

Figura 37 – Padrão de adesão de células HaCaT e correlação topográfica em compósitos de BNC-PLLA/TMC modificados após 14 dias de cultura. Em: A) Micrografia por MEV, com aumento de 25 vezes demonstrando aspecto de superfície do compósito modificado. Círculo pontilhado indicando posição da micrografia B; B) Micrografia por MEV, com aumento de 100 vezes, demonstrando detalhe de irregularidade topográfica em região de compósito modificado. O círculo pontilhado demonstra posição do aumento na micrografia C; C) Micrografia por MEV, com aumento de 500 vezes, evidenciando queratinócitos aderidos junto à irregularidade topográfica; D) Micrografia por técnica confocal, aumento de 200 vezes e pós coloração com DAPI/Faloidina, demonstrando arranjo celular alongado junto às irregularidades do relevo do compósito; E) Micrografia por MEV, aumento de 1000 vezes, demonstrando queratinócitos aderidos e com morfologia espreada. Em F): Repetição da micrografia vista na Figura 36L, obtida por técnica confocal, aumento de 1000 vezes e pós coloração com DAPI/Faloidina, demonstrando células HaCaT com abundante citoplasma espreado.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Os achados quantitativos e qualitativos, de concentração de dsDNA, obtida pela técnica do PicoGreen[®], e das análises à microscopia confocal, respectivamente, conduziram a interpretações congruentes para a maioria das análises. Para os cultivos celulares do primeiro dia, foi a notória a alta concentração de DNA para o grupo PLLA/TMC, achando correspondência nas imagens por microscopia confocal (Figura 34B), onde nota-se, além da alta densidade celular, células com núcleos hiper cromáticos densos e por vezes até fragmentados, podendo corresponder a divisão celular acelerada e até mesmo a instalação de mecanismos apoptóticos (BOUKAMP, 1988; GARCÍA-HEVIA et al., 2016). Interessantemente, não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de DNA para os queratinócitos cultivados sobre a BNC, CP e CPMOD, a despeito da aparente maior densidade celular encontrada sobre os últimos materiais. Esta discrepância pode ser explicada pelo fato de que, nas membranas de BNC, as células, embora aglutinadas em pequenos grupos, encontravam-se distribuídas de maneira mais uniforme sobre toda a superfície, e desta forma alcançando uma densidade celular comparável aos outros grupos. Ao sétimo dia de análises, houve considerável diminuição da concentração de DNA no grupo PLLA/TMC, achado este em concordância com os achados à microscopia confocal, onde verificou-se diminuição da densidade celular. Esta redução da concentração de DNA se deve, possivelmente, a um mecanismo de regulação celular em face à hiper celularidade encontrada ao primeiro dia de cultura (ISSA et al., 2011). Ao final do 14^o dia de cultivo, os grupos CP e CPMOD tiveram significativa diminuição da concentração de DNA, achados estes congruentes com a aparente diminuição da densidade celular observada nas imagens por técnica confocal.

As células HaCaT, queratinócitos humanos de linhagem imortalizada, se constituem em interessante opção celular para estudos de regeneração cutânea *in vitro*, uma vez que representam um dos tipos celulares predominantes para a formação da pele humana, são cultiváveis e propensos a aderir e proliferar ao interagir com biomateriais diversos (GARCÍA-HEVIA et al., 2016; HUNG; SU; TSENG, 2016; PRASAD et al., 2015; RIMPELOVÁ et al., 2014; SADEGHI et al., 2016). Rimpelová et al 2014 estudaram a adesão e proliferação de fibroblastos NIH 3T3 e queratinócitos HaCaT em membranas de PLLA modificadas com plasma argônio, demonstrando que as alterações de superfície diminuíram seus ângulos de contato e aumentaram os graus de rugosidade, levando a um favorecimento à

adesão e proliferação das referidas células. Neste trabalho, os autores avaliaram a morfologia celular com microscopia confocal ao longo dos 3 dias de cultura, observando que os queratinócitos proliferaram em grupamentos isolados, preservando o formato arredondado. Estes achados remetem aos resultados verificados para o grupo de BNC estudado neste trabalho. Ishizaki et al. (2010) estudaram superfícies altamente hidrofóbicas e hidrofílicas, utilizando culturas de fibroblastos de ratos 3T3, observando que as células aderiram em ambas as superfícies, porém seguindo dois padrões: aglutinação de células em pequenos grupos junto às superfícies hidrofílicas e maior distribuição espacial celular quando em contato com as porções mais hidrofóbicas, formando camadas de células mais amplas. Os autores sugerem que as células apoiadas às superfícies hidrofóbicas interagem fracamente com material e priorizam as interações célula/célula, formando camadas de células inicialmente mais densas, justapostas e mais extensas. Os achados deste trabalho, de menor celularidade e aglutinação de grupos celulares junto à BNC, e de maior densidade celular e formação de amplas camadas de células nos grupos PLLA/TMC, CP e CPMO, estão em concordância com as observações feitas por Ishizaki et al. (2010). Outros autores também observaram a preservação da morfologia mais arredondada das HaCaT junto a um arcabouço de queratina, fibrina e gelatina (SINGARAVELU et al., 2016), bem como em superfícies formadas por PLLA em arranjos fibrilares depositados por eletrofiação (SUN et al., 2007), enquanto outros autores verificaram espreadimento celular de queratinócitos aderidos em nanoestruturas de PLGA enriquecidas com colágeno tipo I (SADEGHI et al., 2016) e compósitos de quitosana/policaprolactona (PRASAD et al., 2015). Prasad et al. (2015) observaram maior interação célula-célula e material-célula dos queratinócitos em contato com o compósito contendo quitosana, em comparação à policaprolactona isolada, indicando que as modificações impostas pela adição de quitosana (aumento da rugosidade e maior hidrofiliabilidade pela diminuição do ângulo de contato), favoreceram a adesão celular.

No presente estudo, as análises por MEV, pós microscopia confocal, de amostras de compósitos modificados depois de 14 dias de cultivo de queratinócitos HaCaT, constantes na Figura 37, demonstram marcado espreadimento celular às custas de abundante citoplasma e formação de múltiplos prolongamentos citoplasmáticos (Figura 37E). As imagens por microscopia confocal, obtidas do mesmo material (Figura 37F) delineiam os mesmos achados. Na Figura 37C observam-se detalhes da topografia dos compósitos modificados, onde foram

visualizados agrupamentos de células aderidas às irregularidades do relevo. Em 37D imagens por microscopia confocal demonstram queratinócitos aderidos e assumindo morfologia alongada que acompanha tais modificações de superfície. Embora indiquem firme adesão celular, estes achados morfológicos, em conjunto com os pleomorfismos nucleares identificados, não permitem descartar a ocorrência de disfunção metabólica celular presentes em fenômenos apoptóticos (GARCÍA-HEVIA et al., 2016). Estes achados podem representar um mecanismo misto de apoptose e necrose celular secundária, uma vez que os ensaios *in vitro* comumente realizados não permitem a eliminação de debris celulares e extracelulares pela ausência de agentes fagocitários normalmente presentes em processos *in vivo* (BERTI et al., 2013; ROCHA et al., 2014). De toda maneira, estes achados, após 14 dias de cultura celular, indicam que as células remanescentes, sob estresse metabólico ou não, apresentaram predileção por se manterem na vizinhança das irregularidades das superfícies nestes compósitos de BNC-PLLA/TMC.

A adesão aos diversos biomateriais, processo inicial e fundamental para a viabilidade, proliferação e migração celular, é dependente das complexas relações célula-célula e célula-material (KHALILI; AHMAD, 2015). Estas relações variam conforme o tipo celular, sofrendo influência direta das propriedades físico-químicas do material, advindas da sua composição química, organização estrutural e de superfície (SMITH et al., 2009). O conhecimento das características que definem a superfície de um biomaterial, como sua geometria, sua rugosidade, seu grau de hidrofiliicidade, sua rigidez e sua capacidade de adsorção proteica, é essencial para o entendimento dos mecanismos que levam as células a aderir ou não sobre tais superfícies (AJIRO et al., 2014; BERTI et al., 2013; ISHIZAKI; SAITO; TAKAI, 2010; OLIVEIRA et al., 2001; PRASAD et al., 2015; RIMPELOVÁ et al., 2014; SZOTT; HORBETT, 2011). Embora haja grande variabilidade na quantificação destas propriedades para as diversas combinações de adesão célula-material, em linhas gerais, características de superfície mais favoráveis a adesão e integração celular, incluem superfícies rugosas (BERTI et al., 2013; PRASAD et al., 2015; RIMPELOVÁ et al., 2014), hidrofílicas (ISHIZAKI; SAITO; TAKAI, 2010) e de rigidez intermediária (FIORETTA et al., 2012; ROCHA et al., 2014). As células, quando em contato com determinada superfície, reagem através de complexos mecanismos intra e extracelulares decorrentes dos estímulos químicos e mecânicos recebidos, tipicamente envolvendo a

expressão de integrinas, remodelamento do citoesqueleto e depósito de proteínas na matriz extracelular, que modulam a adesão, proliferação, a viabilidade e o desfecho celular (DALBY, 2005; FIORETTA et al., 2012; KHALILI; AHMAD, 2015; SMITH et al., 2009).

Conforme mencionado anteriormente, a medida do ângulo de contato e o grau de molhabilidade caracterizam o grau o material quanto à hidrofobicidade, sendo que o PLLA/TMC se apresentou como o material menos hidrofílico neste estudo. No entanto, apesar da relativa hidrofobicidade dentre os grupos estudados, (ângulo de contato de 74°) houve substancial adesão e proliferação celular neste grupo das blendas de PLLA/TMC), embora seguindo um padrão segmentar que demonstra aparente favorecimento de interação célula-célula em detrimento das relações célula-material (ISHIZAKI; SAITO; TAKAI, 2010; KHALILI; AHMAD, 2015).

Os resultados obtidos através das culturas celulares no primeiro e sétimo dia, em face às características topográficas dos compósitos, permitem afirmar que ao centro, coincidente com a modificação que resultou no afilamento e remoção parcial da camada superior das blendas, as células apresentaram a tendência de aderir em pequenos grupamentos de células e preferencialmente sobre as áreas de irregularidade da topografia de superfície. Na periferia destes compósitos modificados, nos compósitos não modificados e nas blendas de PLLA/TMC, o padrão de adesão e proliferação celular predominante foi o de adesão celular segmentar e hipercelular. Estes achados estão em concordância com as análises de rugosidade e grau de molhamento de superfície, indicando que nas superfícies mais hidrofílicas e irregulares parece haver uma priorização das interações célula-material, enquanto que nas superfícies mais hidrofóbicas, onde ocorreu a formação grupamentos celulares inicialmente mais densos, sugere-se um maior grau de interação entre as células do que entre as mesmas e o material adjacente. As análises de 14 dias, que demonstraram desaceleração da proliferação mais evidente nos grupos CP e CPMOD, possivelmente refletem os mecanismos celulares de apoptose e necrose secundária de ajuste devido as superpopulações iniciais.

5. CONCLUSÕES

Os trabalhos realizados nesta tese demonstram que foi elaborado, com êxito, um compósito polimérico de BNC-PLLA/TMC com potencial para o tratamento intrauterino dos disrafismos espinhais. Os compósitos, produzidos através da técnica da evaporação do solvente, mostraram-se organizados em 3 camadas, com a BNC ao centro, totalmente envolta por 2 camadas regulares de PLLA/TMC. Em 90 dias, os compósitos se mantiveram totalmente impermeáveis à uma solução de PBS + azida 0,02% e, durante o mesmo período, não sofreram degradação hidrolítica mensurável pelo GPC. As análises de FTIR demonstraram transmitância típica dos grupamentos químicos compatíveis com a estrutura química de ambos os polímeros, bem como confirmaram a total evaporação do clorofórmio, solvente do PLLA/TMC. A associação dos 2 biomateriais resultou em um compósito de alta estabilidade térmica e de performance mecânica intermediária entre as 2 matrizes, adicionando maior flexibilidade à BNC, sem comprometer sua resistência tênsil original. Os compósitos poliméricos de BNC-PLLA/TMC foram modificados em uma das suas superfícies com sucesso, expondo a celulose bacteriana profundamente ao PLLA/TMC. Esta modificação de superfície tornou os novos compósitos mais hidrofílicos e topograficamente mais rugosos. Ensaio *in vitro* de viabilidade celular com fibroblastos L929 não demonstraram citotoxicidade induzida pelos compósitos ou pelas suas matrizes poliméricas. Em outro ensaio *in vitro*, foi demonstrado que queratinócitos humanos (HaCaT) proliferaram sobre todos os materiais. Dois padrões de adesão e proliferação foram identificados: um de pequenos aglutinados celulares, mas difuso, predominante nas membranas de BNC e nas porções centrais dos compósitos modificados; e outro mais celular e segmentar, predominante nas blendas de PLLA/TMC, compósitos não modificados e porções periféricas dos compósitos modificados. Com a manutenção das culturas por 14 dias, houve diminuição da proliferação celular junto aos compósitos originais e modificados a níveis comparáveis entre todos os grupos. Os compósitos de BNC-PLLA/TMC ora testados, em face às suas características físico-químicas e compatibilidade celular com queratinócitos, apresentam grande potencial como plataforma para regeneração tissular em casos de disrafismos espinhais.

6. TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho demonstrou que a associação de dois materiais poliméricos, na forma de um biocompósito de BNC-PLLA/TMC é promissora no engenheiramento tissular para regeneração da pele, em especial para o tratamento intrauterino de disrafismos espinhais. No entanto, desenham-se oportunidades para futuros estudos envolvendo a nanoestruturação da superfície destes compósitos, com vistas a modulação das suas geometrias, graus de rugosidade, rigidez e hidrofobicidade, que venham otimizar o processo de adesão e proliferação celular. Ainda, do ponto de vista celular, ensejam-se investigações dos mecanismos celulares inerentes à adesão, como a expressão de proteínas intracelulares relacionadas com a ativação de integrinas, a reorganização do citoesqueleto e o depósito extracelular de macromoléculas, como colágeno e fibronectina. Em seguida, as membranas resultantes poderão ser estudadas em modelos *in vivo* de mielomeningocele.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADZICK, N. S. et al. A Randomized trial of Prenatal versus Postnatal Repair of Myelomeningocele. *New England Journal of Medicine*, v. 364, p. 993-1004, 2011.

ADZICK, N. S. Prospects for fetal surgery. *Early Human Development*, v. 89, n. 11, p. 881–886, 2013a.

ADZICK, N. S. Fetal surgery for spina bifida: Past, present, future. *Seminars in Pediatric Surgery*, v. 22, p. 10–17, 2013b.

AJIRO, H. et al. Surface control of hydrophilicity and degradability with block copolymers composed of lactide and cyclic carbonate bearing methoxyethoxyl groups. *Polymer (United Kingdom)*, v. 55, n. 16, p. 3591–3598, 2014.

ALMEIDA, I. F. et al. Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 86, n. 3, p. 332–336, 2014.

ALTOMARE, L. et al. Biodegradable microgrooved polymeric surfaces obtained by photolithography for skeletal muscle cell orientation and myotube development. *Acta Biomaterialia*, v. 6, n. 6, p. 1948–1957, 2010.

AURAND, E. R. et al. Building biocompatible hydrogels for tissue engineering of the brain and spinal cord. *Journal of functional biomaterials*, v. 3, n. 4, p. 839–63, 2012.

BADYLAK, S. F.; FREYTES, D. O.; GILBERT, T. W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomaterialia*, v. 5, n. 1, p. 1–13, 2009.

BAI, W. et al. Application of PLGA/type I collagen/chitosan artificial composite dura mater in the treatment of dural injury. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 24, n. 9, p. 2247–2254, 2013.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros*, v. 15, n. 1, p. 13–21, 2005.

BARBOLT, T. A et al. Biocompatibility evaluation of dura mater substitutes in an animal model. **Neurological research**, v. 23, n. 8, p. 813–820, 2001.

BERTI, F. V. et al. Nanofiber density determines endothelial cell behavior on hydrogel matrix. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 8, p. 4684–4691, 2013.

BEVILACQUA, N. S.; PEDREIRA, D. A. L. Fetoscopy for meningomyelocele repair: past, present and future. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 2, p. 283–289, 2015.

BIZZI, J. W.; MACHADO, A. Mielomeningocele: conceitos básicos e avanços recentes. **J Bras Neurocirurg**, v. 23, n. 2, p. 138–151, 2012.

BJUGSTAD, K. B. et al. Biocompatibility of poly(ethylene glycol)-based hydrogels in the brain: An analysis of the glial response across space and time. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 95, n. 1, p. 79–91, 2010.

BOUKAMP, P. Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized. **The Journal of Cell Biology**, v. 106, n. March, p. 761–771, 1988.

BULLARD, K. M.; LONGAKER, M. T.; LORENZ, H. P. Fetal Wound Healing: Current Biology. **World Journal of Surgery**, v. 27, n. 1, p. 54–61, 2003.

CANEVAROLO, S. V. Cromatografia de exclusão por tamanho. In: **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. [s.l: s.n.]. p. 117;145.

COPP, A. J. et al. Spina bifida. **Nature Reviews Disease Primers**, n. April, p. 15007, 2015.

COPP, A. J.; GREENE, N. DE. Europe PMC Funders Group Neural tube defects – disorders of neurulation and related embryonic processes. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, v. 2, n. 2, p. 213–227, 2014.

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

DALBY, M. J. Topographically induced direct cell mechanotransduction. **Medical Engineering and Physics**, v. 27, n. 9, p. 730–742, 2005.

DARGAVILLE, B. L. et al. Cross-linked poly(trimethylene carbonate-

co - L -lactide) as a biodegradable, elastomeric scaffold for vascular engineering applications. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 11, p. 3856–3869, 2011.

DE COPPI, P. et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 100–106, 2007.

DE JONG, W. H.; CARRAWAY, J. W.; GEERTSMA, R. E. In vivo and in vitro testing for the biological safety evaluation of biomaterials and medical devices. Chapter in **Biocompatibility and performance of Medical Devices**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, p. 120-158, 2012.

DONG, J. et al. Enzyme-catalyzed degradation behavior of L -lactide / trimethylene carbonate / glycolide terpolymers and their composites with poly (L -lactide- co -glycolide) fibers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 103, p. 26–34, 2014a.

DONG, J. et al. A bioresorbable cardiovascular stent prepared from L-lactide, trimethylene carbonate and glycolide terpolymers. **Polymer Engineering and Science**, v. 54, n. 6, p. 1418–1426, 2014b.

FAN, Y. W. et al. Adhesion of neural cells on silicon wafer with nanotopographic surface. **Applied Surface Science**, v. 187, n. 3-4, p. 313–318, 2002.

FENG, J.; ZHUO, R. X.; ZHANG, X. Z. Construction of functional aliphatic polycarbonates for biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 37, n. 2, p. 211–236, 2012.

FIORETTA, E. S. et al. Influence of substrate stiffness on circulating progenitor cell fate. **Journal of Biomechanics**, v. 45, n. 5, p. 736–744, 2012.

FUKUSHIMA, K. Poly(trimethylene carbonate)-based polymers engineered for biodegradable functional biomaterials. **Biomater. Sci.**, p. 9–24, 2015.

GARCÍA-HEVIA, L. et al. Nano-ZnO leads to tubulin microtubule assembly and actin bundling, triggering cytoskeletal catastrophe and cell necrosis. **Nanoscale**, v. 8, n. 21, p. 10963–10973, 2016.

GEORGE, J. et al. Characterization of chemically treated bacterial (Acetobacter xylinum) biopolymer: Some thermo-mechanical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.

37, n. 4, p. 189–194, 2005.

GODINHO, J. F. et al. Incorporation of Aloe vera extracts into nanocellulose during biosynthesis. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 545–555, 22 fev. 2016.

GOLDSCHMIDT, E. et al. Construction and in vitro testing of a cellulose dura mater graft. **Neurological Research**, v. 6412, n. April, p. 1–7, 2016.

GOODRICH, J. T.; TEPPER, O.; STAFFENBERG, D. A. Craniosynostosis: posterior two-third cranial vault reconstruction using bioresorbable plates and a PDS suture lattice in sagittal and lambdoid synostosis. **Child's nervous system**, v. 28, n. 9, p. 1399–406, 2012.

GRAF, K. et al. Percutaneous minimally-invasive fetoscopic surgery for spina bifida aperta - Part III - Postnatal neurosurgical interventions in the first year of life. **Ultrasound in obstetrics & gynecology**, v. 47, n. 2, p. 158-61, 2016.

GREENBERG, J. A. et al. Folic Acid Supplementation and Pregnancy: More Than Just Neural Tube Defect Prevention. **Reviews in Obstetrics and Gynecology**, v. 4, n. 2, p. 52–59, 2011.

GUO, Q. et al. In vivo study on the histocompatibility and degradation behavior of biodegradable poly(trimethylene carbonate-co-D,L-lactide). **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 43, n. 6, p. 433–40, 2011.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–321, 2008.

HEFFEZ, D. S. et al. Intrauterine repair of experimental surgically created dysraphism. **Neurosurgery**, v. 32, n. 6, p. 1005–10, 1993.

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

HILL, S. M.; ELWOOD, E. T.; LIN, J. Closure of meningomyelocele defects using acellular dermal matrix. **Journal of Neurosurgery: Pediatrics**, v. 9, n. 2, p. 156–160, 2012.

HU, Y.; CATCHMARK, J. M. In vitro biodegradability and mechanical properties of bioabsorbable bacterial cellulose incorporating cellulases. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 7, p. 2835–2845, 2011.

HUNG, S.-H.; SU, C.-H.; TSENG, H. A trans-well-based cellular model for the rapid pre-evaluation of tympanic membrane repair materials. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 273, n. 8, p. 2027–34, 2016.

HUNT, G. M.; OAKESHOTT, P. Lifestyle in adults aged 35 years who were born with open spina bifida: prospective cohort study. **Cerebrospinal fluid research**, v. 1, p. 4, 2004.

ISHIZAKI, T.; SAITO, N.; TAKAI, O. Correlation of cell adhesive behaviors on superhydrophobic, superhydrophilic, and micropatterned superhydrophobic/superhydrophilic surfaces to their surface chemistry. **Langmuir**, v. 26, n. 11, p. 8147–8154, 2010.

ISSA, R. I. et al. The effect of cell seeding density on the cellular and mechanical properties of a mechanostimulated tissue-engineered tendon. **Tissue engineering. Part A**, v. 17, n. 11-12, p. 1479–1487, 2011.

JI, L.-J. et al. Study on poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate): synthesis and cell compatibility of electrospun film. **Biomedical materials (Bristol, England)**, v. 5, n. 4, p. 045009, 2010.

KHALILI, A. A.; AHMAD, M. R. A Review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 18149–18184, 2015.

KIM, Y. et al. Transparent nanocomposites prepared by incorporating microbial nanofibrils into poly(l-lactic acid). **Current Applied Physics**, v. 9, n. 1 SUPPL., p. 2008–2010, 2009.

KOHL, T. et al. Percutaneous fetoscopic patch coverage of experimental lumbosacral full-thickness skin lesions in sheep. **Surgical endoscopy**, v. 17, n. 8, p. 1218–23, 2003.

KOHL, T. et al. Percutaneous fetoscopic patch closure of human spina bifida aperta: advances in fetal surgical techniques may obviate the need for early postnatal neurosurgical intervention. **Surg Endosc**, v. 23, n. 4, p. 890–895, 2009.

KUNZLER, T. P. et al. Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. **Biomaterials**, v. 28, n. 13, p. 2175–2182, 2007.

LEE, K. Y.; BLAKER, J. J.; BISMARCK, A. Surface functionalisation of bacterial cellulose as the route to produce green polylactide

nanocomposites with improved properties. **Composites Science and Technology**, v. 69, n. 15-16, p. 2724–2733, 2009.

LI, H. et al. Poly(lactide-co-trimethylene carbonate) and polylactide/polytrimethylene carbonate blown films. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 2, p. 2608–21, 2014.

LI, Y. et al. Studies on the degradation of poly(L-lactide-r-trimethylene carbonate) copolymers. **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 966–973, 2013.

LORENZ, H. P.; ADZICK, N. S. Scarless skin wound repair in the fetus. **The Western journal of medicine**, v. 159, n. 3, p. 350–5, 1993.

LOVVORN, H. et al. Distribution and Crosslinking of Collagen From Adult Sheep Wound Repair. **Journal of pediatric surgery**, v. 34, n. 1, p. 218–223, 1999.

MAGANN, E. F.; SANDLIN, A. T.; OUNPRASEUTH, S. T. Amniotic fluid and the clinical relevance of the sonographically estimated amniotic fluid volume: oligohydramnios. **Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1573–85, 2011.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1377–1397, 2011.

MATSUMOTO, Y. et al. Histological examination of expanded polytetrafluoroethylene artificial dura mater at 14 years after craniotomy: case report. **Neurol. Med. Chir.**, v. 53, n. 1, p. 43–46, 2013.

MELLO, L. R. et al. Duraplasty with biosynthetic cellulose: an experimental study. **Journal of neurosurgery**, v. 86, n. 1, p. 143–150, 1997.

MESSIAS, A. D. et al. Synthesis, characterization, and osteoblastic cell culture of poly(l-co-d,l-lactide-co-trimethylene carbonate) scaffolds. **International Journal of Biomaterials**, v. 2014, 2014, Article ID 501789, 7 pages, doi:10.1155/2014/501789.

MEULI, M. et al. Premiere use of IntegraTM artificial skin to close an extensive fetal skin defect during open in utero repair of myelomeningocele. **Pediatric Surgery International**, v. 29, n. 12, p.

1321–1326, 2013.

MICHEJDA, M.; HODGEN, G. D. Induction of Neural-Tube Defects in Nonhuman Primates. **Prog Clin Biol Res**, v. 163B, p. 243-7, 1985.

MITCHELL, L. E. et al. Spina bifida. **Lancet**, v. 364, p. 1885–1895, 2004.

MOCHIZUKI, M.; HIRAMI, M. Structural effects on the biodegradation of aliphatic polyesters. **Polymers for advanced technologies**, v. 8, n. 1996, p. 203–209, 1997.

OLIVEIRA, R. et al. The role of hydrophobicity in bacterial adhesion. **Bioline**, p. 11–22, 2001.

PEDREIRA, D. A. L. et al. Neoskin development in the fetus with the use of a three-layer graft: an animal model for in utero closure of large skin defects. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 24, n. 10, p. 1243–1248, 2011.

PEDREIRA, D. A. L. et al. Endoscopic surgery for the antenatal treatment of myelomeningocele: The CECAM trial. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 214, n. 1, p. 111.e1–111.e11, 2016.

PÊGO, A. P. et al. Biodegradable elastomeric scaffolds for soft tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 87, n. 1-3, p. 69–79, 2003.

PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1277–1286, 2011.

PRASAD, T. et al. Characterization and in vitro evaluation of electrospun chitosan/polycaprolactone blend fibrous mat for skin tissue engineering. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 26, n. 1, p. 5352, 2015.

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, 2008.

RECOUVREUX, D. O. S. et al. Cellulose biosynthesis by the beta-proteobacterium, *Chromobacterium violaceum*. **Current Microbiology**, v. 57, p. 469–476, 2008.

RIMPELOVÁ, S. et al. Surface modification of biodegradable poly(L-

Lactic Acid) by argon plasma: Fibroblasts and keratinocytes in the spotlight. **Plasma Processes and Polymers**, v. 11, n. 11, p. 1057–1067, 2014.

ROCHA, D. N. et al. Poly(Trimethylene Carbonate-co- ϵ -Caprolactone) Promotes Axonal Growth. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88593, 2014.

SAADAI, P. et al. Prenatal repair of myelomeningocele with aligned nanofibrous scaffolds-a pilot study in sheep. **Journal of pediatric surgery**, v. 46, n. 12, p. 2279–83, 2011.

SADEGHI, A. et al. Surface modification of electrospun PLGA scaffold with collagen for bioengineered skin substitutes. **Materials science and engineering: C**, v. 66, p. 130–137, 2016.

SALTZMAN, W. M.; KYRIAKIDES, T. R. Cell interactions with Polymers. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. (Eds.). . **Principles of Tissue Engineering**, . p. 385–406, 2014.

SANCHEZ E OLIVEIRA, R. D. C. et al. Biosynthetic cellulose induces the formation of a neoduramater following pre-natal correction of meningomyelocele in fetal sheep. **Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia**, v. 22, n. 3, p. 174–181, 2007.

SANDLER, A. D. Children with Spina Bifida: Key Clinical Issues. **Pediatric Clinics of North America**, v. 57, n. 4, p. 879-92, 2010.

SINGARAVELU, S. et al. Biomimetic interconnected porous keratin-fibrin-gelatin 3D sponge for tissue engineering application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 810–819, 2016.

SMITH, I. et al. Nano-structured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 1, n. 1, p. 226–236, 2009.

STUMPF, T. R. et al. Enriched glucose and dextrin mannitol-based media modulates fibroblast behavior on bacterial cellulose membranes. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 33, n. 8, p. 4739–4745, 2013.

SULAEVA, I. et al. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. A Review. **Biotechnology**

advances, v. 33, n. 8, p. 1547-71, 2015.

SUN, T. et al. Investigation of fibroblast and keratinocyte cell-scaffold interactions using a novel 3D cell culture system. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 2, p. 321–328, 2007.

SZOTT, L. M.; HORBETT, T. A. Protein interactions with surfaces: Cellular responses, complement activation, and newer methods. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 5, p. 677–682, 2011.

TULIPAN, N.; BRUNER, J. P. Myelomeningocele repair in utero: a report of three cases. **Pediatric neurosurgery**, v. 28, n. 4, p. 177–180, 1998.

VAN LEEUWEN, A. C. et al. In vivo behaviour of a biodegradable poly(trimethylene carbonate) barrier membrane: a histological study in rats. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, n. 8, p. 1951–1959, 2012.

VROMAN, I.; TIGHZERT, L. Biodegradable Polymers. **Materials**, v. 2, n. 2, p. 307–344, 1 abr. 2009.

WANG, X. Overview on Biocompatibilities of Implantable Biomaterials. In: PIGNATELLO, R. (Ed.). **Advances in Biomaterials Science and Applications in Biomedicine**. [s.l.] Intech, p. 112–154, 2013.

WATANABE, M. et al. Complete tissue coverage achieved by scaffold-based tissue engineering in the fetal sheep model of Myelomeningocele. **Biomaterials**, v. 76, n. October, p. 133-43, 2015.

WONG, V. W. et al. Regenerative surgery: Tissue engineering in general surgical practice. **World Journal of Surgery**, v. 36, n. 10, p. 2288–2299, 2012.

WONG, V. W.; GURTNER, G. C. Discussion: Construction and Clinical Application of a Human Tissue-Engineered Epidermal Membrane. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 125, n. 3, p. 910–912, 2010.

YANG, J. et al. Haemo- and cytocompatibility of bioresorbable homo- and copolymers prepared from 1,3-trimethylene carbonate, lactides, and ϵ -caprolactone. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 9999A, p. 397-407, 2010.

YANG, L. Q. et al. Biodegradable cross-linked poly(trimethylene carbonate) networks for implant applications: Synthesis and properties. **Polymer (United Kingdom)**, v. 54, n. 11, p. 2668–2675, 2013.

ZAGANJOR, I. et al. Describing the prevalence of neural tube defects worldwide: A systematic literature review. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–31, 2016.