



“UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Hélida Gomes de Oliveira Barud

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
CITOCOMPATIBILIDADE DE NANOCOMPÓSITOS
BASEADOS EM CELULOSE BACTERIANA E FIBROÍNA
PARA APLICAÇÃO EM REGENERAÇÃO TECIDUAL

ARARAQUARA

2014



"UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Hélida Gomes de Oliveira Barud

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE DE NANOCOMPÓSITOS BASEADOS EM CELULOSE BACTERIANA E FIBROÍNA PARA APLICAÇÃO EM REGENERAÇÃO TECIDUAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Dentística Restauradora, da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho -UNESP, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior

ARARAQUARA

2014

Barud, Héli da Gomes de Oliveira

Caracterização e avaliação de citocompatibilidade de nanocompósitos baseados em celulose bacteriana e fibroína para aplicação em regeneração tecidual / Héli da Gomes de Oliveira Barud -. Araraquara: [s.n.], 2014.

106 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior

1. Materiais biocompatíveis 2. Fibroínas 3. Regeneração tecidual guiada 4. Engenharia Tecidual 5. Tecidos suporte I. Título

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE
DE NANOCOMPÓSITOS BASEADOS EM CELULOSE BACTERIANA
E FIBROÍNA PARA APLICAÇÃO EM REGENERAÇÃO TECIDUAL**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior

2º Examinador: Profa. Dra. Gisele Faria

3º Examinador: Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri

Araraquara, 17 de março de 2014

DADOS CURRICULARES

Hélida Gomes de Oliveira Barud

Nascimento 23/02/1979, Paranavaí, PR.

Filiação Absalão José de Oliveira
Célida Gomes de Oliveira

1998 a 2001 Graduação em Odontologia. Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho- FOAr - UNESP – Araraquara/SP.

2001 a 2001 Aperfeiçoamento em Atualização de Procedimentos Clínicos Integrados. Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho- FOAr - UNESP – Araraquara/SP.

2002 a 2002 Aperfeiçoamento em Atualização em Endodontia. Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho- FOAr - UNESP – Araraquara/SP.

2006 a 2007 Curso de Pós-Graduação em Odontologia em Saúde Coletiva, nível Especialização. Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic - SLMANDIC–Campinas/SP.

2009 a 2010 Aperfeiçoamento em Ortodontia Corretiva. Grupo de Estudos Ortodônticos e Serviços – GESTOS – Araraquara/SP

2010 a 2012 Aperfeiçoamento em Ortodontia Corretiva. Centro de Pós-Graduação em Ortodontia – Ribeirão Preto/SP.

2012 a 2014 Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Dentística Restauradora, nível Mestrado. Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - FOAr - UNESP – Araraquara/SP.

Agradecimientos

À DEUS, muito obrigada pela oportunidade de viver este sonho. Obrigada por cuidar de mim, SEMPRE! Pois eu sei que é o Senhor quem opera o querer e o efetuar no nosso coração, quem capacita e dirige os nossos passos, dando sabedoria, paciência e virtude no caminhar! A Ti, toda a honra e glória!

Ao meu marido HERNANE,

obrigada por ser tão companheiro, compreensivo e amoroso!

Por todo apoio em tudo, inclusive científico! Amo muito você!

Ao meu filho SAMUEL,

você é um presente de Deus na minha vida!

Um filho muito querido, carinhoso e alegre!!

Aos meus amados Pais ABSALÃO e CÉLIDA e irmão LYSIAS EDUARDO

pelo eterno exemplo de luta e determinação baseados no amor.

Obrigado por me ensinarem os valores desta vida

Amo você para sempre!

À todos os meus familiares queridos e amigos que me apoiaram e vibram pelo meu sucesso.

Ofereço esta conquista a vocês, a qual sem o apoio de cada um, não teria o mesmo sentido.

Muito obrigada!.

Ao meu orientador,

Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior

Muito obrigada pela amizade, confiança motivação e otimismo em tudo!

Pela oportunidade de fazer parte de seus conhecimentos e de aprender com sua
dedicação ao trabalho clínico e acadêmico na Odontologia!

Para sempre minha amizade, gratidão e admiração.

AGRADECIMENTOS

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro, muito obrigada por ter aberto as portas, por todo apoio científico e pela oportunidade de aprender muito sobre uma área que agora faz parte da minha formação!

À Diretoria, Coordenação da Pós-Graduação em Ciências Odontológicas e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista.

Ao Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em especial aos professores da Disciplina de Dentística da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr pela convivência e ensinamentos.

Ao Instituto de Química de Araraquara – UNESP e Laboratório de Materiais Fotônicos.

Ao Instituto Fiocruz – BA, representado pelas professoras Camila Indiani, Valéria Matos Borges e a querida Fabiana Celes, muito obrigada pela oportunidade de realizar parte desta pesquisa nos laboratórios desta instituição e por todo o aprendizado científico.

Aos funcionários da Secretaria de Pós – Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, obrigada pela atenção, paciência e dedicação.

A todos os funcionários da Biblioteca da FOAr – UNESP pela disposição de sempre.

Às amigas do Mestrado, Adriana, Marina, Mariana, Vanessa, Keren e Renata. E à todos os meus amigos de pós-graduação: Mateus, Carol, Cris Presosto, Janaína, Mike, Hermes. Muito obrigada pela amizade, pelo convívio, pela comunhão, risadas, aprendizado e por tudo.

Aos queridos Maurício Cavicchioli, Denise, Rafael Romão, César, Maristela, Eliane, Thaís, Robson, Sybele, que muito me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, em etapas diferentes, e que também se tornaram meus amigos!

À todos os queridos amigos que dedicaram atenção e cuidado ao meu filho nos momentos de minha ausência. Muitíssimo obrigada pelo apoio sempre! À toda família do coração conquistada aqui em Araraquara, que tornou minha vida muito mais alegre nesta fase tão intensa. Não tenho palavras para agradecer todo carinho.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudo para realização deste trabalho.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Muito Obrigada!!

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
pois o triunfo pertence a quem se atreve...
E a vida é muito para ser insignificante.”*

Charles Chaplin

**“Educar é ser um artesão da personalidade,
um poeta da inteligência, um semeador de
idéias.”**

Augusto Cury



Resumo

Barud HGO. Caracterização e avaliação da citocompatibilidade de nanocompósitos baseados em celulose bacteriana e fibroína para aplicação em regeneração tecidual [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia UNESP; 2014.

RESUMO

A engenharia de tecidos tem como perspectiva desenvolver opções terapêuticas para quadros clínicos com prognóstico limitado, objetivando substituir ou regenerar os tecidos lesados por meio do uso de biomateriais. A metodologia baseia-se no cultivo de células sobre uma matriz ou *scaffold* que deve ser otimizado para minimizar o risco de infecções e permitir a liberação das moléculas bioativas no local pretendido. As propriedades dos diversos biomateriais são essenciais para o sucesso da metodologia e estes podem ser manipulados de forma a mimetizar a arquitetura da matriz nativa. Assim, nos propomos a desenvolver um novo biocompósito baseado em celulose bacteriana (CB)/ fibroína (FB) visando aplicações em regeneração tecidual na odontologia, em 3 concentrações diferentes (CB/FB25%, CB/FB50% e CB/FB75%). Estes foram caracterizados por análise termogravimétrica, Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FT-IR), Difração de Raios-X, e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), demonstrando boa estabilidade físico-química, inclusive resistência à degradação térmica em altas temperaturas. A investigação da citocompatibilidade foi conduzida por meio de testes *in vitro* apenas com as amostras de CB/FB50%. Os testes aplicados foram MTT, azul de tripano, adesão e proliferação celular. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Graph Prism 5.0. Os resultados demonstraram que o material desenvolvido é biocompatível e não citotóxico. As imagens de MEV revelaram um número muito maior de células aderidas à superfície dos *scaffolds* de CB/FB quando comparado ao de CB pura. Com base nos dados obtidos é possível sugerir que o nanocompósito baseados em CB/FB50% configura uma excelente alternativa como *scaffold* para a reparação de tecidos.

Palavras chave: Materiais biocompatíveis; Fibroínas; Regeneração tecidual guiada; Engenharia Tecidual; Tecidos Suporte.



Abstract

Barud HGO. Characterization and cytocompatibility evaluation of Cellulose and Fibroin based nanocomposites for tissue regeneration applications [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

ABSTRACT

Tissue engineering has the purpose of developping therapeutic options especially designed to be used on limited clinical conditions, aiming to replace or regenerate damaged tissues applying biomaterials for that. The method is based on the cultivation of cells on a matrix or scaffold that should be optimized to offer minimum risk of infections and allow the release of bioactive molecules at the desired location. The success of the methodology depends on Biomaterials' properties that can be manipulated to mimic the three-dimensional architecture of native tissues extracellular matrix. Thus, we purpose to prepare a new nanocomposite based on bacterial cellulose (BC) / fibroin (SF) aiming at applications in the process of tissue regeneration in dentistry. Three different material's compositions were prepared (BC/SF 25 % BC/SF 50 % and BC/SF 75 %) and all of them were characterized by thermogravimetric analysis, Vibrational Spectroscopy in the Infrared Region (FT-IR), X-ray diffraction, and Scanning Electron Microscopy (SEM). The material showed good physical and chemical stability including resistance to thermal degradation at high temperatures. The investigation of the cytocompatibility was realized just using the samples BC/SF 50 % and the in vitro tests conducted were MTT, Trypan Blue, cell adhesion and proliferation assays. The statistical analysis was done applying the software Graph Pad Prism 5.0. The results showed that the developed nanocomposite is biocompatible and non-cytotoxic. SEM images revealed a greater number of cells attached to the scaffold CB / FB surface when compared to pure CB scaffolds. Based on the data obtained, it is possible to suggest that the nanocomposite based on CB/FB50% configures an excellent alternative as a scaffold for tissue repair.

Keywords: *Biocompatible materials; fibroins; Guided tissue regeneration; Tissue Engineering; Tissue scaffolds.*



Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Engenharia tecidual e Biomateriais	19
1.2 Celulose Bacteriana (CB) ou Biocelulose	21
1.3 Fibroína.....	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
3 PROPOSIÇÃO.....	41
4 MATERIAL, MÉTODO E RESULTADO	43
4.1 DESENVOLVIMENTO DO COMPÓSITO BASEADO EM CB/FB	44
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO NANOCOMPÓSITO CB/FB NAS CONCENTRAÇÕES OBTIDAS.....	57
4.3 ESTUDO DA CITOCOMPATIBILIDADE DO NANOCOMPÓSITO CB/FB 50% ..	67
5 DISCUSSÃO.....	80
6 CONCLUSÃO.....	92
7 REFERÊNCIAS.....	94



Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Engenharia tecidual e biomateriais

A variedade de tipos de feridas, com suas fases e modos diversos de cicatrização, levou à evolução de diferentes curativos. A literatura descreve que na pré-história vários agentes como extratos de plantas, água, neve, gelo, frutas e lama eram aplicados sobre as feridas. Na Mesopotâmia, elas eram lavadas com água ou leite, e o curativo era realizado com mel ou resina, sendo que a lã de carneiro, as folhas e cascas de árvores cobriam as lesões (Wieman⁹⁷, 1998). Muitas tentativas de cicatrização foram relatadas na Índia, China e culturas árabes, onde curativos eram cuidadosamente prescritos e realizados através de transplante de partes do corpo, como a pele.

O processo de reparação tecidual compreende dois mecanismos: a regeneração e a cicatrização. A regeneração ocorre por meio da reposição tecidual “original”. Por outro lado, a cicatrização abrange uma série de estágios complexos, interdependentes e simultâneos, e representa o esforço do corpo para restaurar a função e a estrutura natural de um tecido injuriado (Santos⁸⁰, 2000).

A literatura relata que substitutos de pele utilizando células cultivadas sobre matrizes podem proporcionar grande avanço no tratamento clínico e/ou cirúrgico das feridas (Chiu et al.²², 2011; Shevchenko et al.⁸⁶, 2010).

A engenharia de tecidos tem como perspectiva o desenvolvimento de potenciais opções terapêuticas para quadros clínicos com prognóstico limitado, objetivando substituir ou regenerar estrutural e funcionalmente os tecidos lesados por meio do uso de biomateriais. A metodologia baseia-se no cultivo de células sobre uma matriz ou *scaffold*, na presença de fatores de crescimento e as características dos *scaffolds* devem ser otimizadas a fim de minimizarem o risco de uma resposta imunitária, permitindo liberação das moléculas bioativas de forma sustentada e no local pretendido (Cai, Xu¹⁶, 2011; Shi et al.⁸⁷, 2010).

Em termos de aplicabilidade, diversos tecidos como nervoso, ósseo, cartilagenoso, cutâneo, cardíaco têm sido regenerados por meio da engenharia de tecidos (Shi et al.⁸⁷, 2010; Chiu et al.²², 2011; Chen et al.²⁰, 2010). Contudo, um dos desafios existentes permeia o aumento das opções terapêuticas válidas, ampliando as áreas clínicas de interesse.

As propriedades físico químicas, mecânicas e biológicas dos diversos biomateriais são essenciais para o sucesso da metodologia (Armentano et al.³, 2010; Ma⁶⁶, 2008). Assim, os nanomateriais podem ser manipulados de forma a reproduzirem a arquitetura tridimensional da matriz nativa, respeitando sua complexidade e funcionalidade e promovendo a adesão, proliferação e diferenciação celular (Shi et al.⁸⁷, 2010; Ma⁶⁶, 2008; Biondi et al.¹², 2008).

Conforme sua natureza química, um biomaterial pode ser classificado em duas grandes categorias: os naturais, que incluem o colágeno, a seda, a queratina, a elastina, polissacarídeos e tecidos como o pericárdio bovino, e os sintéticos, que incluem as cerâmicas, os polímeros sintéticos, metais e ligas metálicas e os compósitos. Os naturais, além de biocompatíveis, participam no controle da estrutura do tecido e na regulação do fenótipo celular (Chiu et al.²², 2011; Armentano et al.³, 2010; Cunha et al.²³, 2011).

Materiais como o colágeno, categorizado como um polímero natural, apresenta-se como o principal composto orgânico do tecido ósseo, e vem sendo amplamente usado como material na fabricação de biomateriais. Contudo, sua utilização apresenta algumas desvantagens, como alto custo, dificuldade de controlar contaminações e encontrar materiais padronizados a partir das fontes comerciais, tornando difícil o controle do processo (Kong et al.⁵⁶, 2004).

Ao se utilizar os biomateriais para estimular a reparação, o controle da biodegradabilidade é de extrema importância, já que o material não deve deteriorar antes da recuperação da região onde foi implantado, mas deve ser substituído gradativamente à medida que o processo ocorre (Cunha et al.²³, 2011).

Atualmente, polímeros naturais como a celulose bacteriana e a fibroína da seda têm sido aplicados no processo de reparação tecidual, tanto na forma pura quanto nas diversas modificações e compósitos que estes polímeros podem originar, levando também a uma grande diversidade de técnicas de tratamento, desde o recobrimento de feridas quanto a aplicações na engenharia tecidual, como matrizes de scaffolds. Assim, vale a pena ressaltar as principais propriedades inerentes a estes biomateriais objetivando suas aplicações no processo de reparo tecidual na odontologia.

1.2 Celulose Bacteriana (CB) ou biocelulose

A CB ou biocelulose apesar de possuir uma estrutura química semelhante a da celulose proveniente das plantas, difere-se dela por ser obtida por meio da bactéria *Acetobacter xylinum* (*Glucanoacetobacter xylinus*). Este microorganismo gram-negativo tem a habilidade de sintetizar celulose abundantemente, em um meio de cultura que apresente fontes de carbono e nitrogênio (Klemm et al.⁵⁵, 2005; Barud et al.⁹, 2011). Como resultado, a bactéria excreta em torno de 50-80 microfibrilas de celulose de 3,0 – 3,5 μm de espessura, que se agregam formando fitas. O aspecto final assemelha-se a uma membrana gelatinosa.

A biocelulose é considerada pura quimicamente, ou seja, livre de lignina e hemicelulose, cujas fibras se organizam em um arranjo estrutural tridimensional, o qual gera um sistema altamente cristalino (60-80%) com excelente resistência mecânica (Klemm et al.⁵⁵, 2005). Essa morfologia nanométrica confere a CB grande área superficial, alta capacidade de absorção e retenção de água, boa elasticidade, além de ser facilmente moldável.

Dentre as propriedades físicas, mecânicas e biológicas da CB, Czaja et al.²⁴(2007) descrevem que esta promove uma barreira física contra infecções bacterianas, facilmente esterilizável, não alergênica, possui baixo custo e simplicidade de manipulação. Além disso, os

mesmos autores relatam que seu uso pode diminuir significativamente a dor durante determinados tratamentos, pois a celulose não é tóxica, é biocompatível.

Em relação à biocompatibilidade, a literatura relata diversos estudos *in vivo* utilizando a celulose bacteriana, desde a substituição da parede abdominal (Falcão et al.²⁹⁻³⁰, 2008) e implantes no dorso de ratos (Helenius et al.³⁸, 2006), no tratamento de úlceras crônicas (Alvarez et al.²2004) e stents vasculares (Klemm et al.⁵⁵, 2005)

Em continuidade sobre as diversas aplicações da celulose bacteriana, pesquisadores têm desenvolvido uma classe de novos nanocompósitos multifuncionais baseados em celulose bacteriana (Barud⁸, 2010). Os novos materiais podem ser utilizados como biocurativos antimicrobianos, substratos flexíveis para aplicações, além de sensores foto-eletrocrômicos (Barud et al.⁶⁻¹⁰, 2007, 2008, 2010, 2011, 2012; Saska et al.⁸¹, 2011; De Salvi et al.²⁵, 2012).

1.3 Fibroína

Proteínas naturais da seda têm sido muito usadas no campo médico como material de sutura há séculos (Unger et al.⁹², 2004). A fibroína da seda pode ser facilmente manipulada em diferentes formas, por exemplo, em redes, hidrogéis, filmes e scaffolds 3D (Kasoju, Bora^{47,49}, 2012; Kundu et al.⁵⁷, 2013). Por sua grande versatilidade, esta proteína pode ser concebida para se adaptar às propriedades específicas exigidas pelo tecido a ser regenerado (Jones et al.⁴⁶, 2009).

Recentemente, vários pesquisadores têm investigado a fibroína como um recurso promissor para biotecnologia e material biomédico devido à sua biocompatibilidade com diversos tipos de células, alta permeabilidade para o oxigênio e vapor d'água, controle de biodegradabilidade e mínima reação inflamatória (Ge et al.³⁴, 2012). Outras propriedades importantes, como resistência mecânica, flexibilidade possibilitaram sua utilização como substratos para cultura celular, imobilização enzimática, lentes de contato com alta

permeabilidade ao oxigênio, agentes de liberação de drogas e proteção de feridas (Meinel et al.⁶⁹, 2006; Badami et al.⁴, 2006; Kundu et al.⁵⁸, 2013).

Além disso, a fibroína de seda vem se destacando por possibilitar a deposição de hidroxiapatita ou apatita durante testes de calcificação in vitro em soluções que simulam o fluido corpóreo (Kong et al.⁵⁶, 2004; Nogueira et al.⁷¹, 2009).

Assim, a fibroína pura ou associada a outros materiais ainda atua na regeneração de tecidos vascular, nervoso, epitelial, ósseo, cartilaginoso, de tendões e ligamentos, cardíaco, oftálmico, hepático, medula espinhal, traquéia e tímpano (Kundu et al.⁵⁷, 2013)

No ramo de cosméticos, fornecedores garantem que quando em contato com a pele, as proteínas da seda recuperam a hidratação e a textura suavizando rugas. A seda ainda possui propriedades como efeito antibacteriano e de proteção da pele contra radiação ultravioleta e eletricidade estática (Li et al.⁶³, 2011) e excelente elasticidade (Altman et al.¹, 2003; Kim et al.⁵³, 2011).

Apesar de demonstrar tais propriedades e um alto potencial de aplicação médica ou mesmo cosmética, a fibroína de seda ainda é pouco explorada no Brasil, mesmo o país ocupando a terceira posição no ranking da produção mundial. Deste modo, fazem-se necessárias novas pesquisas focadas neste biomaterial, pois além de o uso de fibroína da seda em aplicações biomédicas ser economicamente vantajoso, é um recurso natural, renovável, disponível em abundância no país e com custo relativamente baixo: aproximadamente R\$ 6,00/kg de casulos (Sabbag et al.⁷⁸, 2013).

De acordo com o exposto, ambos biomateriais anteriormente descritos (CB e FB) possuem excelentes propriedades e são largamente empregados, de maneira individual, em áreas biomédicas.

O nanocompósito desenvolvido neste estudo visou compensar as limitações da CB e da Fibroína, um em relação ao outro, uma vez que a celulose contribuiria aumentando a resistência mecânica ao material e a fibroína agregando as propriedades biodegradabilidade, efeito antimicrobiano e de porosidade, influenciando positivamente na adesão e crescimento celular junto ao scaffold, a fim de desenvolver um biomaterial de base para aplicações na cavidade oral, em tecido gengival, mucoso, pulpar e ósseo. O biomaterial também poderia atuar como um veículo para liberação lenta de fármacos para controle da halitose, da cárie dental ou doença periodontal.



Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

A literatura apresenta-se muito vasta sobre a aplicação da Celulose Bacteriana e da Fibroína, como também das técnicas derivadas das modificações relacionadas aos mesmos para restaurar a função e a estrutura natural de um tecido injuriado. Assim, alguns estudos referentes aos últimos anos foram levantados.

2.1 Celulose Bacteriana (CB)

Os primeiros relatos que descrevem a Celulose Bacteriana (CB), na literatura, remetem a Brown¹⁵ (1886) e Fontana et al.³² (1990) foi o pioneiro em descrever o emprego da celulose bacteriana em substituição à pele em queimados. Desde então, o uso da CB como biocurativo apresenta-se vantajoso e tem sido aprimorado gradativamente, tanto na forma pura quanto modificada resultando em diferentes compósitos para aplicações médicas diversas e mais atulamente no campo da engenharia tecidual.

Portal et al.⁷⁶(2009) realizaram um estudo empregando curativos à base de CB comercializados como DermafillTM (AMD/Ritmed, Tonawanda, NY) na reparação tecidual de úlceras crônicas de difícil cicatrização. Os resultados obtidos demonstraram uma redução claramente satisfatória de 79 dias, em média, para se atingir 75% de regeneração da ferida quando comparado ao grupo que recebeu o curativo de rotina.

Wippermann et al.⁹⁹ 2009, realizaram um estudo implantando stents vasculares de CB, produzidos por meio de técnicas de engenharia tecidual, na substituição de fragmentos da artéria carótida em 8 porcos. Os resultados indicam que ocorreu um rápido recobrimento de células endoteliais e a CB permitiu uma deposição de três camadas destas nas paredes dos fragmentos. Concluíram que os stents permaneceram estáveis e que o material é promissor para a cirurgia cardiovascular.

Outros autores aplicaram a CB na regeneração de tecidos obtendo excelentes resultados de cicatrização e reparo em tecido ósseo e conjuntivo, usando uma associação de CB e hidroxiapatita (Grande et al.³⁶, 2009).

Em um estudo *in vitro*, Cai, Kim¹⁷(2010), avaliaram a biocompatibilidade tecidual de *scaffolds* de CB e CB/ PEG (polietilenoglicol) utilizando fibroblastos 3T3 em testes preliminares de adesão celular. Após 48 h de incubação, os autores observaram que os *scaffolds* de CB/PEG apresentaram uma maior adesão e proliferação celular que a CB pura, sugerindo que o material pode ser usado no tratamento de feridas e na engenharia tecidual.

Scaffolds microporosos de CB previamente semeados com células tronco uroteliais foram implantados em camundongos por Bodin et al.¹³ (2010). Os resultados do estudo *in vivo* mostraram que o scaffold foi capaz de permitir o crescimento e a diferenciação das células tronco em células uroteliais e musculares.

Em um estudo *in vivo*, De Souza et al.²⁶ (2010) realizaram implantes de CB para medialização da laringe em 32 coelhos. Todos receberam implantes em uma das pregas vocais e na outra água destilada como controle. Os animais foram acompanhados por 4 meses de estudo, e os resultados apontaram uma diferença significativa nos tecidos circundantes ao material implantado, demonstrando indícios de angigênese e proliferação do tecido conjuntivo. A CB manteve-se estável durante todo o período em que o animal foi acompanhado sem apresentar qualquer reação de corpo estranho.

Pertile et al.⁷⁴(2010) aumentaram a concentração dos grupos funcionais da superfície da CB modificando-a com plasma. Deste modo, estudos de adesão e proliferação foram conduzidos semeando células endoteliais humanas (HMEC-1) e neuroblastos de ratos (N1E-115). Os resultados demonstraram um aumento significativo na proliferação das células utilizadas, demonstrando grande potencial de aplicação do material em engenharia de tecidos.

Wei et al.⁹⁵ (2011) prepararam filmes de CB com um agente antimicrobiano (cloreto de benzalcônio) objetivando criar um sistema de liberação controlada para ser aplicado futuramente no tratamento de feridas agudas. Após testes antimicrobianos realizados in vitro, concluíram que o filme foi capaz de reduzir o crescimento de bactérias gram positivas demonstrando o potencial e a performance do material produzido.

Chiaoprakobkij et al.²¹ (2011) desenvolveram um compósito baseado em Celulose Bacteriana /Alginato para ser aplicado como curativo temporário de feridas cirúrgicas da mucosa oral. O material foi concebido com um design diferenciado: a camada externa apresenta-se mais densa para evitar as contaminações bacterianas e desidratação da ferida enquanto que a camada mais interna é porosa e destinada a drenar o exudato. Testes preliminares de biocompatibilidade in vitro demonstraram que o material apresentou um bom desempenho permitindo a proliferação de queratinócitos e fibroblastos gengivais.

Em um estudo in vivo, Saska et al.⁸¹ (2011) demonstraram o potencial de regeneração de membranas de CB e Hidroxiapatita (HA) aplicadas em defeitos ósseos criados em tíbias de ratos. Após 1 semana, não havia sinal de inflamação e após 4 semanas, o defeito foi completamente preenchido. Deste modo, os autores concluíram que o uso das membranas acelerou a formação óssea.

Pertile et al.⁷⁵ (2012) demonstraram que scaffolds de CB modificados por proteínas recombinantes IKVAV-CBM3 permitiram e melhoraram significativamente a adesão, crescimento e proliferação de linhagens de células mesenquimais e neuronais.

De maneira semelhante, Saska et al.⁸² (2012) também modificaram a CB com peptídeos moduladores de fatores de crescimento ósseo (OGP) com o objetivo de avaliar a mutagenicidade e genotoxicidade e determinar o poder osteoindutor em em estágios preliminares de calcificações. Concluíram que a CB não apresenta estes efeitos citotóxicos indesejáveis e os

peptídeos adicionados favorecendo a mineralização, indicando que o material é seguro para aplicações biomédicas na engenharia tecidual.

Em um artigo de revisão, Fu et al.³³ (2012) ressalta as principais propriedades e as várias aplicações biomédicas relacionadas a materiais baseados em CB, como: substituição de pele, vasos sanguíneos, córnea, uretra, cartilagem, menisco artificiais, válvulas cardíacas e também como dispositivos de liberação controlada de medicamentos, proteínas e hormônios. Os mesmos autores relatam que pesquisas relacionadas à CB e suas aplicações como substitutos de pele continuarão a representar grande importância no futuro.

Kim et al.⁵⁴ (2013) conduziram um estudo empregando scaffolds nanofibrilares sintetizando a CB pura para aplicações no tratamento de perfurações de membranas timpânicas. Os ensaios in vitro indicaram viabilidade, adesão e proliferação celular e, in vivo, o material promoveu uma melhor recuperação da ferida, demonstrando ser um dispositivo aplicável na regeneração de perfurações timpânicas.

Lin et al.⁶⁴ (2013) prepararam membranas de CB e Chitosana (CH) para o recobrimento de feridas. Após realizarem toda a caracterização físico-química, e testes in vitro de validação do material como avaliação da citotoxicidade por MTT e também ação antimicrobiana, concluíram que o material permitiu a adesão e proliferação de fibroblastos L929 e, quanto ao efeito antimicrobiano, a adição de chitosana reduziu significativamente a contaminação para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo seguro para as aplicações sugeridas. Estes resultados permitiram aos autores a condução de um estudo in vivo, utilizando as membranas no recobrimento de feridas causadas no dorso de 18 ratos machos para avaliar o potencial regenerativo do material. Após 8 dias de tratamento, as feridas demonstraram completa epitelização. Histologicamente, observou-se deposição organizada de fibras colágenas e uma fina camada de epitélio maduro. Ambos materiais apresentaram excelentes resultados quanto ao reparo tecidual, permitindo a formação de uma pele saudável e normal. Contudo, as membranas

de CB/CH apresentaram um melhor desempenho macroscópico na redução da ferida e, histologicamente foi possível observar glândulas sebáceas e a formação de novos folículos pilosos.

Recentemente, Shah et al.⁸⁴ (2013) e Hu et al.⁴¹ (2014) publicaram um artigo de revisão de literatura abordando conceitos atualizados sobre os métodos de produção e síntese da CB, as técnicas e as diversas modificações deste material bem como suas aplicações na bioengenharia, visando aumentar o interesse da comunidade científica em desenvolver novas idéias e dispositivos neste campo.

E por fim, Zang et al.¹⁰⁵(2014) objetivaram explorar o potencial da CB na engenharia tecidual, semeando células tronco derivadas do tecido adiposo sobre matrizes de CB, produzindo scaffolds. Estes foram avaliados quanto à diferenciação osteogênica por meio de Von Kossa, Alizarin vermelho, Fosfatase alcalina (ALP) e PCR. Após esta confirmação do potencial osteogênico, os scaffolds foram implantados em defeitos ósseos criados em ulnas de coelhos. Os autores concluíram que os scaffolds produzidos apresentam excelente habilidade de reparo em defeitos ósseos constituindo uma importante ferramenta para a engenharia tecidual.

2.2 Fibroína (FB)

O uso da seda nas áreas biomédicas iniciou em meados dos anos 30, segundo Omenetto, Kaplan⁷²(2010). Contudo a seda empregada ainda apresentava problemas com a biocompatibilidade (Altman et al.¹, 2003) por causa do processamento do material que necessitava ser purificado. Desde então, os conhecimentos sobre a estrutura e síntese da FB levaram à descoberta de suas propriedades e até composição através do sequenciamento genômico de suas proteínas (Zhou et al.¹⁰⁶, 2000).

À partir deste ponto, as pesquisas evoluíram de tal maneira que a FB além de ser aplicada diretamente em curativos para regeneração de feridas ela tem sido aplicada na

fabricação de matrizes funcionais para a concepção de scaffolds na engenharia de tecidos. Semelhantemente à CB, a literatura é muito ampla sobre a manipulação, modificações, propriedades e aplicações deste polímero natural.

Desta forma, Yang, Zang ¹⁰¹(2008) prepararam membranas de FB e sobre estas foram cultivadas células epiteliais da córnea de coelhos para a fabricação de scaffolds. Após observado crescimento celular testes de citotoxicidade por meio de MTT foram realizados para seguramente aplicar os ensaios in vivo. Estes foram conduzidos implantando-se scaffolds no estroma de coelhos. Observou-se que após 8 semanas havia o crescimento de novos vasos e, após 12 semanas, o material estava parcialmente degradado, demonstrando a boa biocompatibilidade do material caracterizando-o como uma opção bem sucedida para a engenharia de tecidos.

Unger et al. ⁹² (2004) e Nogueira ⁷¹ (2009) realizaram testes de crescimento celular in vitro em membranas de fibroína de seda utilizando fibroblastos, queratinócitos ou osteoblastos e verificaram que todas as células aderiram e se espalharam nos espaços entre as fibras ou na superfície das membranas.

Fang et al. ³¹(2009) realizaram um estudo contruindo scaffolds de FB onde foram semeados tendócitos de ratos de 5 dias de vida para crescimento e adesão celular. A FB é rica em aminoácidos alcalinos Arg-Gly-Asp (RGD) que são conhecidos por serem receptores celulares e mediar importantes interações entre células de mamíferos e matrix extra-celular (MEC), facilitando a adesão crescimento celular. Após o preparo e incubação dos tendócitos nos scaffolds e avaliação da viabilidade por MTT, estes foram implantados em defeitos causados em tendões de Aquiles de 26 coelhos brancos. Todos os animais foram operados cirurgicamente nos dois tendões, recebendo o implante em um dos lados e o outro permaneceu sem tratamento. Os pesquisadores observaram que após 2 semanas os animais já estavam saltando normalmente e, após 16 semanas o tendão havia sido regenerado completamente, sendo difícil distinguir a área de reparo. Histologicamente, feixes de fibras colágenas estavam bem alinhados e demonstraram

uniformidade. Os autores concluíram que a FB configura uma excelente opção para enxertos na regeneração do tendão de Aquiles no modelo animal utilizado.

Jones et al.⁴⁶(2009) realizaram um estudo comparando o desempenho de 4 diferentes materiais como matrix para scaffolds: um de FB estabilizado com metanol, outro também de FB estabilizado em vapor, o terceiro de chitosana e o quarto de ácido polilático (PLLA). Estes foram colocados em culturas de células osteoclásticas e osteoblásticas isoladamente e também em uma cultura que continha ambas as células em proporções pré-determinadas. Os resultados demonstraram que o PLLA suportou a adesão e proliferação apenas dos osteoblastos. Por outro lado, os outros materiais testados atuaram na diferenciação, adesão, crescimento e proliferação celular em todas as culturas testadas.

Pesquisadores do Instituto biomédico de Taiwan (Yang et al.¹⁰²) realizaram um estudo em 2009, fabricando matrizes de FB híbridas com chitosana (CH) e ácido hialurônico (HA) para permitir o crescimento e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas provenientes da medula óssea (MSCs), no intuito de utilizar estes scaffolds na reconstrução do miocárdio necrosado por infarto. Após a caracterização da superfície dos materiais por FTIR, análise da viabilidade por MTT, citometria de fluxo, PCR em tempo real e imunofluorescência, os autores concluíram que os scaffolds produzidos induziram a diferenciação das MSCs em células cardíacas que aderiram e proliferaram, constituindo uma excelente opção para regeneração de tecidos cardíacos.

Enomoto et al.²⁸ (2010) realizaram um estudo para avaliar o potencial da FB em gerar pequenas próteses para serem aplicadas na cirurgia vascular, pois os enxertos de vasos provenientes de material sintético com diâmetro inferior a 5mm estão associados a uma alta incidência de trombose vascular. Deste modo, scaffolds de três camadas de FB, de diâmetro de 1,5 mm e comprimento de 10 mm foram inseridos em uma região segmentada da aorta abdominal de ratos. Como controle negativo, os animais receberam scaffolds baseados em

politetrafluoretileno (PTFE) fabricados nos mesmos padrões dos de fibroína. Para acompanhar a regeneração tecidual, foram implantadas células ósseas indiferenciadas nos animais com marcadores específicos. Após um mês de acompanhamento, os scaffolds de FB demonstraram uma permeabilidade para a migração celular significativamente maior (85,1%) quando comparados aos scaffolds de PTFE (30%). Através dos marcadores, os testes revelaram que as células migraram para as camadas mais internas e médias dos scaffolds, além do aumento da deposição de colágeno e absorção da FB. Ou seja, em todos os aspectos avaliados no estudo a FB apresentou-se superior, degradando lentamente à medida em que ocorreu a regeneração do tecido vascular. Além disso, as proteínas naturais presentes na FB conferem ao material uma superfície antitrombótica.

De forma semelhante, Marelli et al.⁶⁸(2010) confeccionaram scaffolds de FB por meio de eletrospinning para serem também aplicados em enxertos vasculares de pequenos diâmetros. Além da biocompatibilidade e outras propriedades já conhecidas da FB em relação ao crescimento e adesão celular, testes específicos revelaram que este scaffold apresentou uma excelente resistência mecânica, suportando os impactos simulados a valores de pressão arterial superiores a 180-220 mm Hg.

Unger et al.⁹³(2010) realizaram um estudo para avaliar histológica e imunohistoquimicamente *scaffolds* confeccionados com matrix de FB, semeados com células endoteliais microcapilares humanas (HDMEC) e células osteoblásticas primárias (HOS), mantidos em cultura para uma pré-vascularização, sendo implantados em 8 camundongos. Os resultados demonstraram que o material apresentou uma ótima interação com os tecidos circundantes, rapidamente o scaffold foi vascularizado e que pode ser aplicado, futuramente no tratamento de defeitos ósseos extensos.

Outro estudo aplicando a fibroína na concepção de scaffolds para regeneração de tecidos bem específicos foi conduzido em 2010 com o objetivo de estimular a regeneração da membrana timpânica (Levin et al.⁶², 2010).

Em 2010, Kim et al.⁵² conduziram um estudo in vivo para comparar o desempenho de membranas de celulose versus membranas de FB na regeneração de membranas timpânicas perfuradas cirurgicamente por meio de otomicroscopia. Foram empregados 50 ratos todos foram perfurados bilateralmente, 10 receberam nenhum tratamento e os outros 40 animais receberam a celulose em um lado e as membranas de FB no outro lado. Os animais foram analisados todos os dias, por 14 dias, por meio de otomicroscopia para verificação do aspecto macroscópico e também ao completar um mês, antes de serem sacrificados para possibilitar as análises histológicas. Deste modo, os autores concluíram que os achados evidenciaram que a FB acelerou e auxiliou o encolhimento e reparo das lesões causadas nos tímpanos dos animais avaliados.

Em 2011, Wang et al.⁹⁴ e Wei et al.⁹⁶ realizaram dois estudos muito semelhantes em que scaffolds de baseados em FB, originaram outros compósitos híbridos por técnicas distintas. Contudo, ambos atuaram como veículos para crescimento de células tronco indiferenciadas do tecido adiposo e também como suporte para estruturar a região de nervos ciáticos de ratos que foram cirurgicamente injuriados. Os resultados demonstraram que a regeneração do nervo afetado foi significativamente melhorada com o uso do biomaterial, demonstrando continuidade com os tecidos circundantes bem como reinervação das áreas alvo.

A regeneração de cartilagens apresenta-se como um desafio na medicina. Deste modo, Talukdar et al.⁹¹ (2011) realizaram um estudo empregando scaffolds porosos baseados em FB na tentativa de elucidar a relação célula-scaffold e célula-célula. Diferentes densidades iniciais de células foram semadas nos scaffolds que permaneceram em cultura por 2 semanas. Os resultados demonstraram que a espessura e a massa úmida aumentaram em até 70% nas densidades iniciais de maior número de células semeadas quando comparadas às menores.

Mecanicamente, as maiores densidades iniciais exibiram de 4 a 5 vezes mais resistência à compressão do que as de menor densidade. Este estudo, portanto, demonstra a relevância do preparo inicial do scaffold para que possa oferecer uma maior desempenho clínico na formação rápida de tecido cartilaginoso.

Dentre os inúmeros artigos publicados na literatura relativos à extração e manipulação da fibroína em suas diversas formas de aplicação, destaca-se o estudo de Rockwood et al.⁷⁷ (2011), publicado na revista Nature, por conter a metodologia adotada nos Laboratórios de Materiais Fotônicos do Instituto de Química da Unesp – Araraquara e que foi empregada neste estudo.

Ainda em 2011, o mesmo grupo de pesquisa publicou dois estudos similares (Madden et al.⁶⁷ e Bray et al.¹⁴) empregando membranas de FB como matrizes para o crescimento de células com o objetivo de se obter scaffolds para transplantes de córneas. No primeiro estudo citado, as células utilizadas foram endoteliais indiferenciadas da córnea humana (B4G12) e no segundo estudo, as células são provenientes do sistema límbico humano (HLE). Em ambos modelos pré-clínicos, observou-se que a adesão e proliferação destas células ao material foi bem sucedida e que a fibroína pode ser um material promissor na construção de tecidos para futuros transplantes de córneas.

Patra et al.⁷³ (2012) realizaram um estudo sobre o emprego da FB como matrix para a confecção de retalhos ou scaffolds para serem aplicados na reconstrução cardíaca. Para tanto, cardiomiócitos de ratos de 3 dias de vida foram semeados sobre o material, que após o preparo, foi submetido a testes de adesão e atividade metabólica celular, reação a estímulos extracelulares (por meio de testes in vitro como o MTT) e contratilidade (por meio de imagens de vídeo). Os resultados demonstraram que facilmente podem ser obtidos retalhos com propriedades contráteis para futuras aplicações cirúrgicas do miocárdio.

Kasoju, Bora⁴⁸(2012) confeccionaram scaffolds para serem aplicados na regeneração tecidual hepática à partir de matrizes de FB e CH aplicando técnicas de eletrospinning. Os materiais devem ser funcionalizados de tal maneira que permitam a adesão, crescimento e proliferação de hepatócitos ativos. Após feita a caracterização físico-química dos scaffolds, foram conduzidos testes in vitro para averiguar a citotoxicidade por meio de MTT. Os resultados revelaram que o material é indicado para o propósito que foi concebido pois este mimetiza tanto a arquitetura quanto a composição da matrix extracelular hepática, permitindo a adesão e confluência celular.

Além do estudo supracitado, os mesmos pesquisadores (Kasoju, Bora⁴⁷, 2012) elaboraram scaffolds de FB funcionalizados com curcumina. Esta substância é um pigmento indiano que contém uma mistura de antioxidantes fitonutrientes fortes, dotada de propriedades anti inflamatórias. Diversos estudos buscaram sua eficácia na prevenção de cânceres de mama, cavidade oral, estômago, esôfago, intestino, cólon, pulmão e fígado (Dulbecco, Savarino²⁷, 2013). Após a caracterização do material, imunofluorescência, cinética e testes in vitro de bioatividade relativos à ação anticarcinogênica, os autores observaram que a FB contribui para que liberação do princípio ativo da curcumina seja lenta e sustentada. Além de todas as propriedades de biocompatibilidade e indução de reparo tecidual, sugere-se que scaffolds baseados em FB e curcumina, de caráter multifuncional, podem ser futuramente aplicados em feridas após remoção cirúrgica de nódulos cancerígenos de mama, fígado dentre outras aplicações biomédicas.

Um estudo relevante estudo in vivo foi apontado na literatura no ano de 2012. Pesquisadores (Ge et al.³⁴, 2012) avaliaram o reparo de feridas cirúrgicamente provocadas na mucosa bucal de 90 ratos empregando membranas de FB. Os animais foram divididos em 3 grupos de acordo com o tratamento a ser recebido: A) membrana porosa de FB; B) filme de FB e C) controle. Após 5 dias as feridas dos grupos A e B apresentaram-se visualmente bem menores

do que as presentes no grupo controle, indicando reparo. Além da observação visual, vários outros parâmetros clínicos foram avaliados associados com as respostas imunológicas locais e sistêmicas por meio de avaliação histológica, imunohistoquímica e análises do linfócito T. Os resultados permitiram aos autores concluir que o uso de FB na mucosa oral de ratos reduziu sensivelmente o grau de encolhimento da ferida, induzindo a adesão, crescimento e proliferação celular, caracterizando o material como uma excelente indicação para reparo em cirurgia oral.

Em 2013, Seok et al.⁸³, realizaram um estudo in vivo criando defeitos bilaterais no osso parietal da calota craniana de 20 coelhos. Os animais foram divididos em 3 grupos de acordo com o tratamento a ser aplicado: A) membranas de FB funcionalizadas com 3% de 4-hexilresorcinol (composto orgânico com anestésicos e anti-sépticos, dotado de propriedades anti-helmínticas), B) membrana de colágeno e C) nenhum tratamento. Cada animal foi avaliado por micro-CT antes do sacrifício, nos períodos de 4 e 8 semanas. Após o estudo estatístico, as análises histológicas revelaram que a quantidade de neoformação óssea nos animais tratados com as membranas de FB foi muito maior do que nos animais tratados com as membranas de colágeno e daqueles que ficaram sem tratamento.

Cattaneo et al.¹⁸ (2013) realizaram um experimento implantando diretamente scaffolds de diâmetros inferiores a 6 mm concebidos para aplicação em cirurgia vascular nas aortas abdominais de ratos. Observou-se remodelação da região lesada em 7 dias, com a presença de células endoteliais, musculares e também a organização da camada mais interna e média dos vasos, sem a necessidade de celularização prévia. Ou seja, mesmo implantando os scaffolds sem semear células previamente, como preconizam as técnicas da engenharia de tecidos, os pesquisadores concluíram que o material atuou de maneira excepcional na regeneração tecidual vascular.

Kundu et al.⁵⁷(2013) publicaram um estudo de revisão sobre materiais baseados em fibroína da seda para regeneração tecidual, demonstrando as diversas formas de manipulação e

síntese do biomaterial, propriedades estudadas, bem como as aplicações nos mais diversos tecidos: vascular, nervoso, epidermal, ósseo, cartilaginoso, cardíaco, ocular, hepático, intervertebral e também no reparo de tendões e ligamentos e da traquéia.

No ano de 2014 Shi et al.⁸⁸ realizaram um estudo desenvolvendo *scaffolds* de esferas de FB previamente preparadas com células tronco derivadas do tecido adiposo para tratamento de esfíncter uretral deficiente. Após os testes in vitro de citotoxicidade por MTT, os pesquisadores implantaram o material em ratos que simulavam incontinência urinária severa. Os animais foram acompanhados por 4, 8 e 12 semanas e os resultados demonstraram ser promissores para a regeneração dos tecidos afetados, indicando que o material pode ser aplicado na engenharia de tecidos e biomedicina.

Ainda relativo ao ano de 2014, Gu et al.³⁷ desenvolveram *scaffolds* de FB/CH para aplicação na regeneração nervosa. Para tanto, células provenientes da matrix extracelular denominadas células de Schwann foram semeadas e cultivadas sobre os scaffolds. Estes materiais foram implantados em ratos que apresentavam lesões cirúrgicamente feitas no nervo ciático de cerca de 10 mm, ligando as extremidades. Após 4 e 14 dias e também 12 semanas, os animais foram submetidos a testes eletrofisiológicos para a verificação do reflexo nervoso antes de serem sacrificados para permitir a avaliação histológica. Os resultados demonstraram que o material resultou em um reparo tecidual excelente e representa um novo delineamento na regeneração de nervos periféricos.

2.3 Celulose Bacteriana (CB)/ Fibroína (FB)

Em relação ao compósito proposto no presente estudo, baseado em CB/FB a literatura levantada aponta os estudos abaixo relacionados.

Foi encontrado um estudo desenvolvido por Wu et al.¹⁰⁰, em 2012, cuja aplicação em indústria têxtil não caracteriza o alvo deste trabalho. Os pesquisadores desenvolveram

compósitos reforçando a seda usada na indústria têxtil com celulose bacteriana por meio de uma técnica específica de síntese. Após avaliação do material por meio de MEV, FTIR, análise térmica (TG), Raio-X (XRD) e resistência à tração, os pesquisadores observaram que a presença da CB aumentou a cristalinidade, a estabilidade térmica e também melhorou a resistência à tração da seda, aumentando-a em 213%, caracterizando a CB como um bom material de reforço.

De maneira semelhante, Shang, et al.⁸⁵ (2013) desenvolveram um compósito na forma de filme utilizando celulose comum como reforço da FB. O material foi caracterizado por meio de FTIR, Microscopia de Força Atômica (AFM), testes mecânicos de tração e análise térmica. Os resultados indicaram que as propriedades físicas da FB melhoram. Nos filmes com a conformação FB/CB 75%, houve aumento da resistência à tração e da estabilidade térmica e os filmes de FB/CB 50% apresentaram uma maior elasticidade e uma maior homogeneidade de superfície.

Apenas um artigo, dentre os levantados, apresentou composição e aplicação sugerida semelhante ao confeccionado neste estudo. Deste modo, Lee et al.⁶⁰ (2013) fabricaram membranas de FB/CB, realizaram caracterização do compósito por meio de MEV e também testes para avaliar as propriedades mecânicas como resistência à tração. Após esta etapa, os pesquisadores conduziram experimentos in vivo empregando o compósito de FB/CB em defeitos bilaterais causados cirurgicamente em arcos zigomáticos de 15 ratos. Todos os animais receberam o material em um dos lados e o outro permaneceu como controle de reparo, sem receber material algum. Os ratos foram divididos em grupos e sacrificados de acordo com os períodos pré-estabelecidos: 1, 2, 4 e 8 semanas. Antes do sacrifício, cada animal foi submetido a avaliação por micro-CT e também radiográfica como parâmetro comparativo. Após o sacrifício, as áreas de interesse foram removidas e avaliadas histologicamente. A observação visual macroscópica revelou ausência de edema, hematoma ou qualquer outra característica que denotasse inflamação. As imagens radiográficas e tridimensionais geradas pela micro-CT, após 4

semanas, revelaram formação óssea de tal maneira que havia continuidade na região que o osso havia sido seccionado, sendo que o grupo controle permaneceu com a região ainda seccionada. Histologicamente, nos grupos que receberam o compósito, havia reação inflamatória mínima após 1 semana, formação óssea em duas semanas, pontes ósseas ligando as extremidades do defeito em 4 semanas e, em 8 semanas reparo total da lesão e reabsorção do material implantado. No grupo controle foi observada necrose na região segmentada, reação inflamatória mediana na segunda semana e na oitava semana, necrose tecidual nas extremidades do segmento ainda presente.

Portanto, os resultados divulgados neste estudo demonstram que compósitos baseados em FB/CB caracterizam uma excelente opção como sistemas efetivos de fixação em casos de fratura óssea, acelerando também o reparo tecidual ósseo.



Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivos:

- I) Desenvolver um novo nanocompósito baseado em CB/Fibroína para aplicação em regeneração tecidual em odontologia
- II) Caracterizar físico-quimicamente o novo nanocompósito em função de diferentes proporções de CB/Fibroína
- III) Estudar a citocompatibilidade do nanocomposto CB/Fibroína que apresentar a melhor característica físico-química



*Material, Método e
Resultado*

4.1 DESENVOLVIMENTO DO COMPÓSITO BASEADO EM CB/FB

MATERIAL E MÉTODO

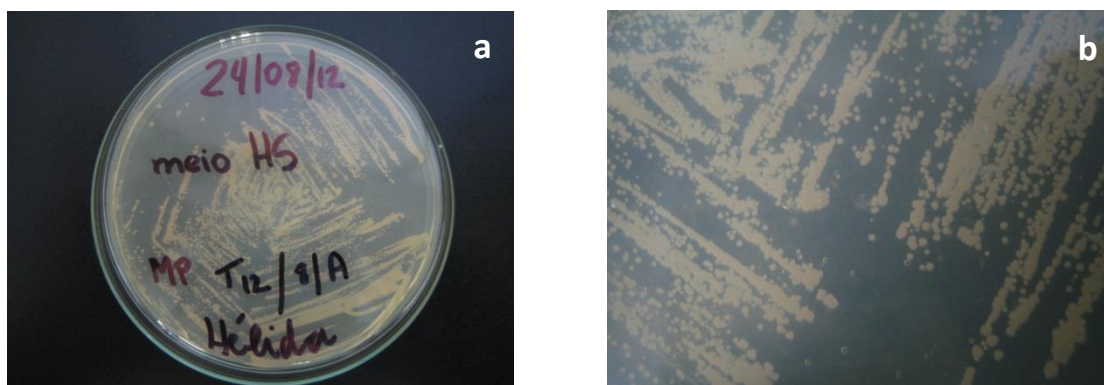
A obtenção dos materiais celulose bacteriana, fibroína, e dos nanocompósitos CB/fibroína, na forma de *scaffolds* foi desenvolvida nos laboratórios do grupo de fotônicos do Instituto de Química – UNESP sob a co-orientação do professor doutor Sidney José Lima Ribeiro e do pós-doutorando Maurício Cavicchioli.

4.1.1 Obtenção das membranas de celulose bacteriana

a) Reativação dos microorganismos

Os microorganismos *Gluconacetobacter xylinus*, ATCC 23769, não patogênicos, gentilmente doados pela Fundação André Tosello, foram semeados para serem reativados em placas petri em meio sólido Hestrin e Schramm (HS) na Capela de Fluxo laminar (PA 210, Pachane®). O meio HS é composto em g/L por glicose 20, extracto de levedura 5, peptona bacteriológica 5, Na_2HPO_4 2.7, ácido cítrico 1.15 e ágar 20, pH 4.5 ± 0.1 . Foram armazenados em estufa a 28°C por 24h. Foram semeadas de uma a duas alçadas bem cheias, por esgotamento. Após o crescimento nas placas, observou-se a sua morfologia para verificar a contaminação do meio: as colônias são arredondadas, não muito opacas e levemente esbranquiçadas (Figura 1).

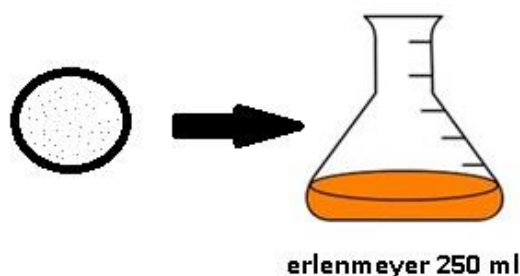
Figura 1 -a) placa de petri com as colônias semeadas por esgotamento; b) visão mais aproximada das colônias. Araraquara, 2014.



b) Pré-inóculo

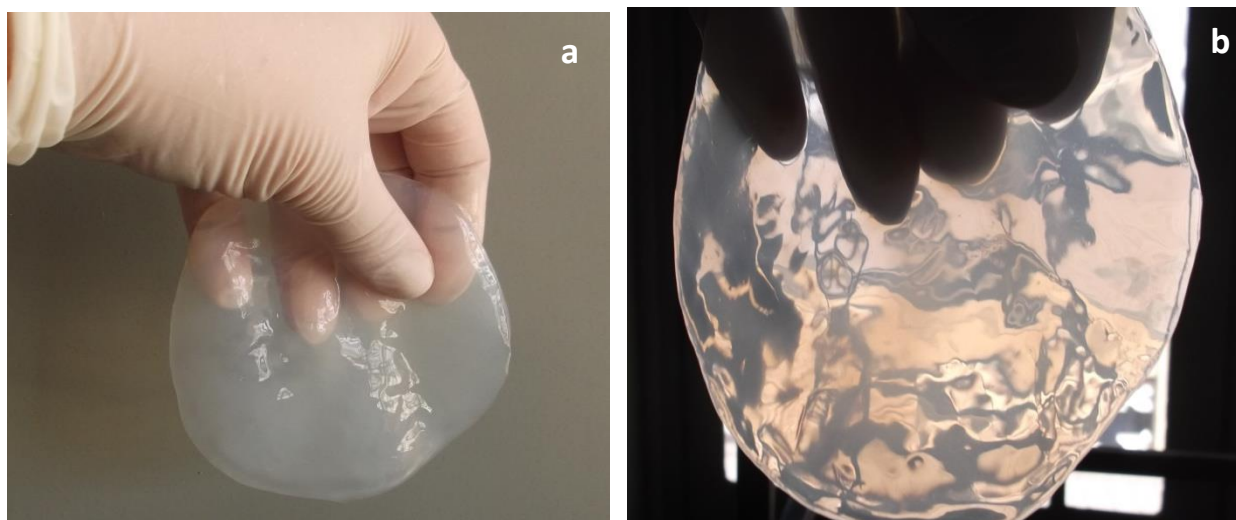
Após a reativação, novamente na capela de fluxo laminar, as bactérias foram semeadas em meio líquido composto em g/L por glicose 50, extrato de levedura 4, K_2PO_4 2, MgSO_4 0,73 e etanol 20 (este foi misturado à glicose, após autoclavar e depois adicionado ao restante, para formar o MP). Foram utilizadas 4 alçadas cheias, raspando-se levemente da placa de petri para se obter o pré-inóculo e inoculadas em 3 erlenmeyers de 250 ml, com 50 ml do MP, conforme a Figura 2. Este foi levado à estufa, 28°C por 24h.

Figura 2 - Preparo do pré-inóculo. Araraquara, 2014.

**c) Crescimento das mantas**

À partir dos 3 pré-inóculos preparados foram obtidas 15 mantas redondas produzidas nos erlenmeyers de 500 ml (Figura 3). Em fluxo laminar, foram inoculados os erlenmeyers contendo 90 ml de MP e 10 ml de pré-inóculo, resultando num volume final de 100 ml por frasco, respeitando a proporção de 10% V/V (Volume final /Volume do pré-inóculo). Os frascos foram armazenados em estufa BOD a 28°C, por 96 horas.

Figura 3 – a) e b) Aspecto das mantas obtidas. Araraquara, 2014.



d) Lavagem das membranas e remoção das bactérias

Nesta etapa preparou-se previamente uma solução 1 M de uma solução de NaOH (hidróxido de sódio) da seguinte maneira: 40g de NaOH em 1000 ml de H₂O destilada. À partir desta solução, respeitando a proporção 10% V/V, foram realizadas duas lavagens da membrana em uma solução final de 0,1 M de NaOH aquecida a 80°C, por cerca de 1 hora cada lavagem. Ou seja, para cada 900 ml de H₂O destilada, foram usados 100 ml da solução de 1M de NaOH preparada previamente. Em seguida, foi realizada mais uma lavagem a 80°C apenas em H₂O destilada. Posteriormente, as membranas foram lavadas em água corrente para neutralizar o pH, durante cerca de 24h(Figura 4). O pH foi aferido usando um Medidor de Bancada (Tecnopon - MPA-210) para conferir se estava próximo a 7,5. Assim, as membranas foram armazenadas em água destilada, na geladeira, na temperatura de aproximadamente 4°C. Deste modo, as membranas permanecerão com as suas características conservadas até que a etapa seguinte relativa à extração da fibroína seja concluída.

Figura 4 – Lavagem das mantas. Araraquara, 2014.



e) Morfologia das membranas

A morfologia das membranas, tanto na forma úmida quanto na seca, foi verificada para averiguar a uniformidade das mesmas, o que pode influenciar na padronização do biomaterial a ser produzido. Neste estudo, das 15 membranas úmidas obtidas, foram escolhidas 4 aleatoriamente para esta verificação e uma foi moída no dispersador ULTRA-TURRAX® (T 65 D, IKA®) para soltar as fibras para a verificação da massa seca. Estas mesmas 4 membranas depois foram secas em batentes de teflon, na estufa a 28°C, durante 48 h, e também foram mensuradas.

A massa foi obtida utilizando-se balança digital de precisão (modelo AR 2140, Adventurer™, OHAUS), na forma úmida e seca, o que também permitiu o cálculo da porcentagem de água e massa seca. Para padronizar a massa úmida as membranas foram deixadas sob peso constante de aproximadamente 1 kg, entre papel filtro, por 5 minutos sendo removido o excedente de água. O diâmetro das membranas foi mensurado em 3 pontos diferentes, com uso de régua, para que a área das mesmas também fosse calculada, em cm². A espessura também foi aferida em 3 pontos diferentes da membrana, com o auxílio de paquímetro digital (MarCal 16 EX, Mahr®) apenas encostando levemente suas hastes na superfície do material sem exercer pressão para não marcar a membrana (Figura 5).

Figura 5 - Aferição da espessura das membranas com paquímetro digital. Araraquara, 2014.



A porcentagem de água também foi calculada por proporção usando como referência o peso em gramas das membranas úmidas e secas usadas.

Para a obtenção da massa seca, uma membrana foi moída no dispersador ULTRA-TURRAX[®] (T 65 D, IKA[®]) para soltar as fibras. Toda a água excedente foi removida. Em balança digital (modelo AR 2140 Adventurer[™], OHAUS), pesou-se 1g de massa úmida. Depois, este 1g de massa úmida foi colocado em uma placa de petri aberta, levada à estufa 28°C, durante 48 h para promover a evaporação total da água, e fosse pesada novamente. Assim, por meio de um cálculo de regra de três simples, foi mensurada a porcentagem de massa seca.

E por fim, outro parâmetro avaliado na verificação da produção da CB foi a verificação da produção em g/L. Esta é calculada também por meio de regra de três simples partindo da média obtida da massa seca no volume em que foi produzido.

4.1.2 Obtenção da Fibroína

A solução de fibroína foi preparada de acordo com procedimento já descrito pela literatura por Rockwood et al.⁷⁷ (2011), e reproduzido também nos laboratórios do grupo de materiais fotônicos do Instituto de Química – UNESP. A proteína fibroína foi extraída dos casulos de bicho-da-seda da espécie *Bombyx mori* adquiridos da empresa Bratac, localizada na cidade de Bastos-SP.

a) Degumação dos casulos de bicho-da-seda (*Bombyx mori*)

Esta primeira etapa faz-se necessária para que a sericina presente nos casulos do bicho-da-seda seja removida e seja obtida fibroína pura. Então, em uma cuba de aquecimento (foi usado um evaporador rotativo HB4 basic Ika[®] WERKE) preparou-se uma solução de Na₂CO₃ (Carbonato de Sódio) na seguinte proporção: 4L de água MiliQ (água deionizada) e 8,48 g do referido sal. Aqueceu-se a solução até ebulição, por aproximadamente 15 minutos.

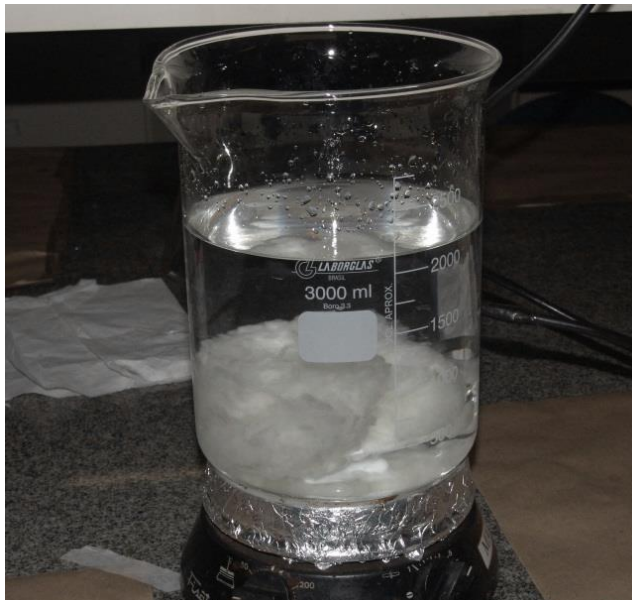
Em seguida, adicionou-se à solução 10,00 g de casulos do bicho-da-seda cortados em lascas (Figura 6). Deixou-se a solução em ebulição por 30 min exatos. A fim de se esfriar as fibras de fibroína, elas foram colocadas em um béquer com pequena quantidade de água MiliQ até o esfriamento.

Figura 6 - a) Casulos do bicho-da-seda, b) Casulos cortados em lascas, c) Cuba de aquecimento contendo a solução de Na₂CO₃ e os casulos cortados em lascas. Araraquara, 2014.



Já em temperatura ambiente, as fibras de fibroína foram colocadas em um béquer com 2L de água MiliQ por 2,5 horas, sob agitação e sem aquecimento. Após esse tempo, a água MiliQ foi trocada, e deixou-se em repouso por mais 20 min. (Figura 7).

Figura 7 - Fibras de fibroína em água MiliQ. Araraquara, 2014.



Assim, a água foi removida, e as fibras foram secas em estufa à 37°C (Figura 8). Após estarem secas, as fibras foram pesadas. Foram obtidas 6,97 g fibras de fibroína degumada.

Figura 8 – Fibroína degumada obtida. Araraquara, 2014.

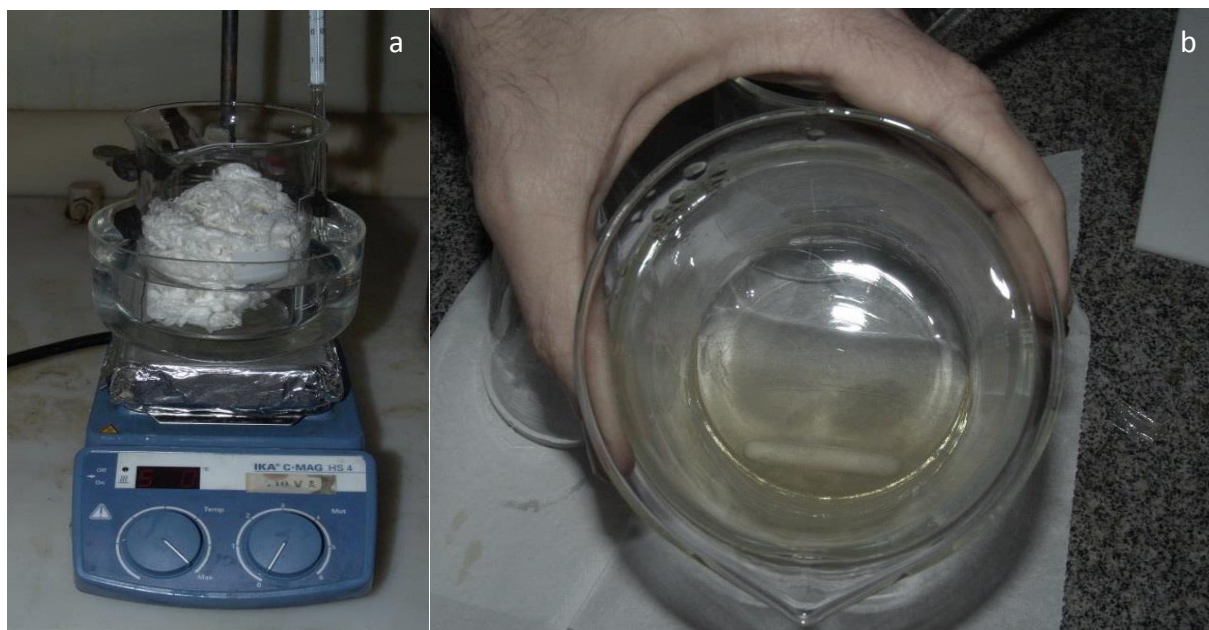


b) Solubilização da fibroína

Em um béquer em banho-maria, adicionou-se os 6,97 g de fibroína seca obtidos na etapa anterior, 41,82 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cloreto de Cálcio hidratado), 26,21 mL de etanol e 30,77 mL de água MiliQ.

Deixou-se em aquecimento até a temperatura de 80°C, na qual as fibras foram solubilizadas por completo. Uma solução viscosa amarelada, semelhante a um mel, foi obtida e deixada em repouso (Figura 9).

Figura 9 - a) Fibras imersas na solução de etanol, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e água MiliQ, aquecidas em banho maria; b) Fibras completamente dissolvidas, resultando em uma solução viscosa e amarelada. Araraquara, 2014.

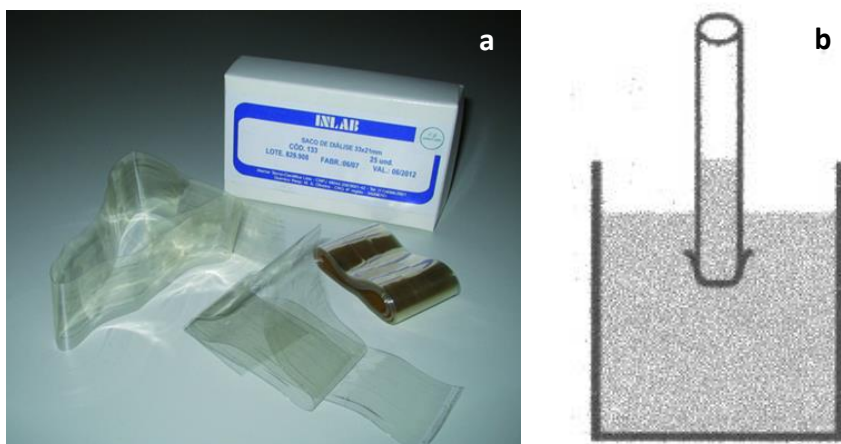


c) Diálise

Esta etapa de diálise faz-se necessária para a remoção do sal que está impregnado na solução de fibroína obtida no passo anterior (Figura 10).

Deste modo, a solução amarelada e viscosa foi colocada em uma membrana de diálise e deixada sob agitação em um béquer com 2 L de água MiliQ. A água foi trocada após 1, 4, 12, 24, 36 e 48 horas após o início, completando 48 horas de diálise e 6 trocas de água.

Figura 10 - a) Membranas de diálise e b) Esquema demonstrando a solução de fibroína a ser dialisada no interior da membrana inserida em um béquer com os 2 L de água MiliQ a serem trocados. Araraquara, 2014.



d) Centrifugação

A solução obtida foi centrifugada duas vezes a 20.000 rpm e 4°C por 30 min, e em seguida mantida sob refrigeração. A centrifugação foi realizada para remover as impurezas da solução de fibroína (Figura 11).

Figura 11 – Centrifugação da solução de fibroína após a diálise para a remoção das impurezas.

Araraquara, 2014.



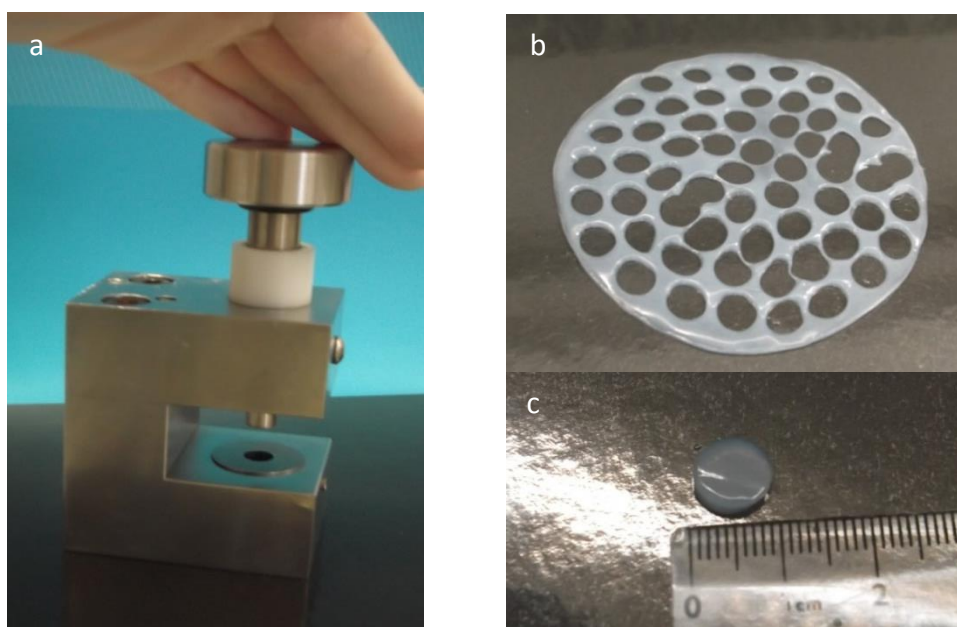
e) Determinação da concentração de fibroína (m/v) e estocagem

Após a centrifugação, a solução de fibroína foi mantida sob refrigeração (5° C). Uma amostra dessa solução foi colocada em estufa a 37°C para a secagem da água e assim determinar a concentração massa /volume (m/v) da proteína na solução obtida.

4.1.3 Preparação do nanocompósito de Celulose bacteriana e Fibroína (CB/FB)

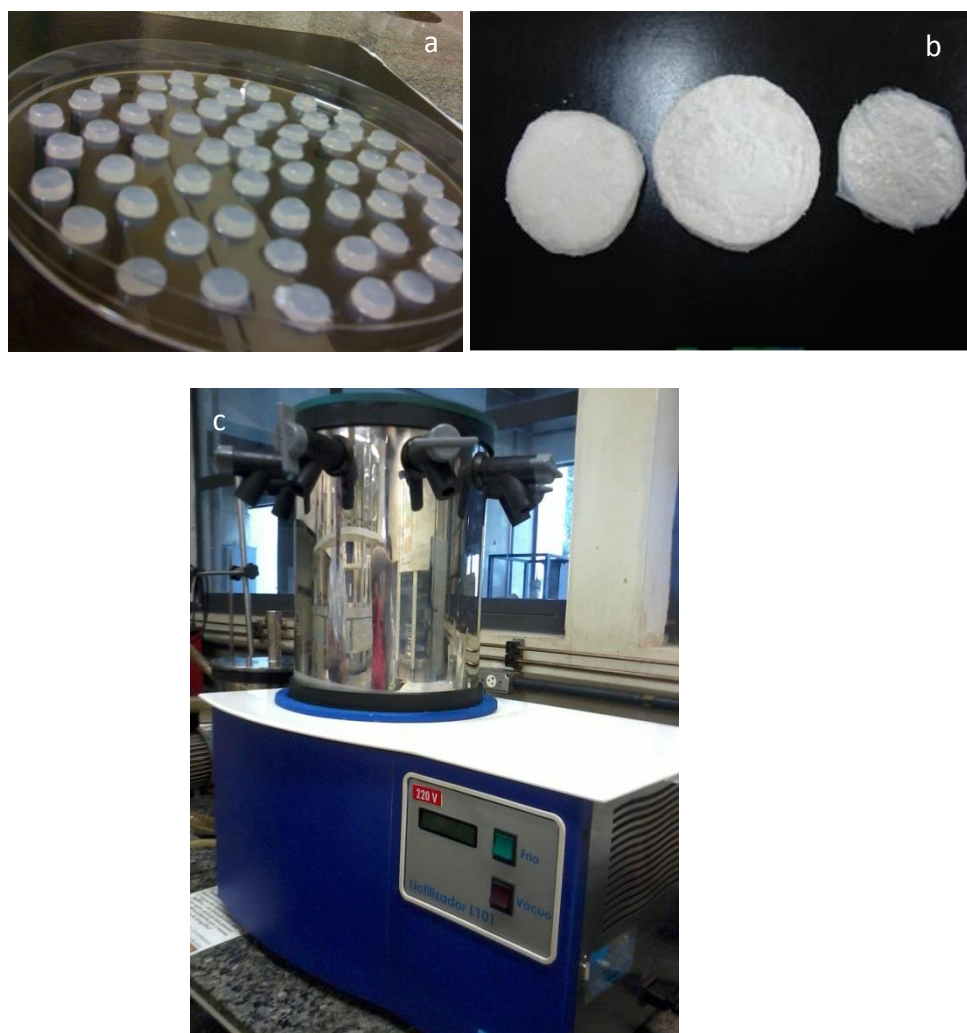
Antes de se iniciar a preparação do compósito, as membranas hidratadas de CB que foram obtidas em etapas anteriores e estavam estocadas foram cortadas com um perfurador específico para tanto, a fim de padronizar as amostras para que se apresentem de diâmetro equivalente aos poços das placas em que serão realizados os testes in vitro (Figura 12). Todas as 10 membranas que ainda estava estocadas, foram perfuradas, perfazendo um total de 240 amostras de celulose úmida, padronizadas em aproximadamente 8 mm de diâmetro.

Figura 12 - a) Perfurador de CB; b) Membrana úmida que foi perfurada; c) Amostra de CB padronizada em aproximadamente 8 mm de diâmetro. Araraquara, 2014.



Os compósitos de celulose bacterina (CB) e fibroína da seda (FB) foram preparados imergindo 120 amostras de CB padronizadas (aproximadamente 0.5 cm^2) em soluções de FB de diferentes concentrações (1%, 3% 7% massa/volume) a fim de trocar a água pela solução de fibroína dentro da rede microfibrilar de celulose. As membranas de CB foram mantidas nas soluções de FB por 24 horas sob agitação, removidas e congeladas. Após o congelamento, as amostras foram liofilizadas, deixando no liofilizador por 48h (Liobras L101) (Figura 13).

Figura 13 - a) Amostras congeladas; b) Amostras do compósito de CB/FB a 1, 3 e 7%, após liofilizadas, antes de serem esterilizadas e c) Liofilizador (labtop 10). Araraquara, 2014.



As outras 120 amostras de celulose bacteriana pura também foram congeladas e liofilizadas. Deste modo, *scaffolds* de CB pura também foram produzidos para assumirem o papel de controle, no momento dos testes in vitro e in vivo que serão realizados posteriormente.

As porcentagens finais de FB nos compósitos de CB-FB foram determinadas por meio de medições gravimétricas. As amostras foram renomeadas de acordo com o conteúdo de FB: CB-FB 25%, CB-FB 50% e CB-FB 75%. Ao final de todo processo foram obtidas 120 amostras. Estas foram separadas em grupos de 5, lacradas em envelopes e foram esterilizadas com radiação gama (25 KGy) pela empresa Embrarad (Cotia – SP). Deste modo o biomaterial está livre de possíveis contaminações e adequado para as etapas experimentais subsequentes.

RESULTADO

Abaixo, as Tabelas 1, 2, 3 e 4 indicam os valores obtidos para as categorias avaliadas, tanto para as membranas úmidas quanto as secas.

Tabela 1- Valores resultantes da caracterização morfológica das membranas na forma úmida. Araraquara, 2014.

membrana úmida	espessura (mm)				massa (g)	diâmetro(mm)			
	1	2	3	média espessura		1	2	3	média D
1	1,41	1,77	1,91	1,70	17,4890	95,00	97,00	95,00	95,67
2	1,32	1,42	1,55	1,43	15,4840	94,00	96,00	96,00	95,33
3	1,74	1,59	1,91	1,75	18,9770	93,00	94,00	94,00	93,67
4	1,40	1,54	1,61	1,52	15,8440	95,00	95,00	97,00	95,67
Total				1,60	16,95				95,08

Tabela 2 -Principais medidas de resumo das membranas na forma úmida. Araraquara, 2014.

	espessura (mm)	massa (g)	diâmetro(mm)	área (cm²)	água (%)
média	1,60	16,95	95,08	709,96	99,34
variância amostra	0,02	1,94	0,69	151,79	0,003
desvio	0,13	1,39	0,83	12,32	0,05
nível de confiança	0,15	1,58	0,94	13,94	0,06
IC _{95%}	1,60 ±0,15	16,95 ±1,58	95,08 ± 0,94	709,96 ± 13,94	99,34 ± 0,06
n	4	4	4	4	4

Tabela 3 - Valores resultantes da caracterização morfológica das membranas na forma seca. Araraquara, 2014.

membrana seca	espessura (mm)				massa (g)	diâmetro(mm)			
	1	2	3	média espessura		1	2	3	média D
1	0,03	0,04	0,04	0,04	0,1136	94,00	93,00	95,00	94,00
2	0,03	0,03	0,03	0,03	0,1101	94,00	94,00	94,00	94,00
3	0,03	0,03	0,04	0,03	0,1120	94,00	92,00	93,00	93,00
4	0,03	0,04	0,03	0,03	0,1144	92,00	94,00	95,00	93,67
Total				0,03	0,11				93,67

Tabela 4 - Principais medidas de resumo das membranas na forma seca. Araraquara, 2014.

	espessura	massa (g)	diâmetro	área (cm²)
média	0,033	0,113	93,667	688,728
variância amostra	0,000	0,000	0,167	35,915
desvio	0,002	0,002	0,408	5,993
nível de confiança	0,003	0,002	0,462	6,782
IC _{95%}	0,03±0,003	0,11±0,002	93,67±0,46	688,73±6,78
n	4	4	4	4

A porcentagem de massa seca obtida foi de 2,25 % e a produção de celulose bacteriana da cepa ATCC 23769 foi de 1,13g/L (gramas por litro).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO NANOCOMPÓSITO CB/FB NAS CONCENTRAÇÕES OBTIDAS

MATERIAL E MÉTODO

4.2.1 Caracterização Físico-química

A caracterização do nanocompósito obtido foi realizada por meio de análise termogravimétrica (TG), Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FT-IR), Difração de Raios-X, e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), sendo analisados 3 espécimes para cada técnica.

A análise termogravimétrica permitiu observar a perda de massa da amostra em função da temperatura. Esta técnica é utilizada para caracterizar a estabilidade térmica de polímeros frente a várias condições experimentais. As curvas de TG foram expressas em gráficos de porcentagem de perda de massa versus temperatura.

As curvas TG foram realizadas utilizando-se amostras secas em um Termoanalizador TG / DTA simultâneo SDT 2960 (TA Instruments, New Castle, EUA), nas seguintes condições: cadinho de alumínio, ar sintético (100 mL/min.) e razão de aquecimento de 10°C por minuto, de 30° a 1000°C.

A análise por FT-IR teve como objetivo observar a estrutura da substância, pois a técnica evidencia grupos de átomos que dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência independente da estrutura da molécula. Assim, examinando o espectro e comparando-o com tabelas, foi possível realizar a identificação das estruturas presentes na substância analisada.

Os espectros de infravermelhos foram registados no equipamento FT-IR 2000 de Perkin Elmer, utilizando as amostras preparadas como pastilhas de KBr. Os espectros foram

obtidos na faixa de 4.000-700 cm^{-1} , com 32 varreduras, resolução de 2 cm^{-1} e intervalo de 0,5 cm^{-1} . Os espectros de FT-IR da CB, FB e dos compósitos CB-FB foram registrados.

A técnica de Difração de Raios-X foi empregada para a identificação da estrutura fina do material. No princípio era usada apenas para a determinação da estrutura cristalina. Com o desenvolvimento da técnica, hoje é usada para vários fins como análises químicas, medidas de tamanho de partículas e determinações de orientações de cristais.

Os difratogramas de raios-X (XRD) foram obtidos num difratômetro Siemens Kristalloflex radiação Cu K- α , ângulo 2θ de 4 a 70°, em passos de 0,02 ° e um tempo de passo de 3s.

E por fim, as imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas com o uso de um Microscópio JEOL JSM - 7500F. O MEV produz imagens de alta resolução da superfície amostra (em até 300.000 x de aumento), o que permitiu avaliar e observar as características estruturais da substância analisada.. As amostras foram cuidadosamente seccionados no plano horizontal, com uma lâmina de barbear, montados com fita adesiva condutora em porta-amostras de cobre e revestidos com uma camada de carbono depositada por evaporação.

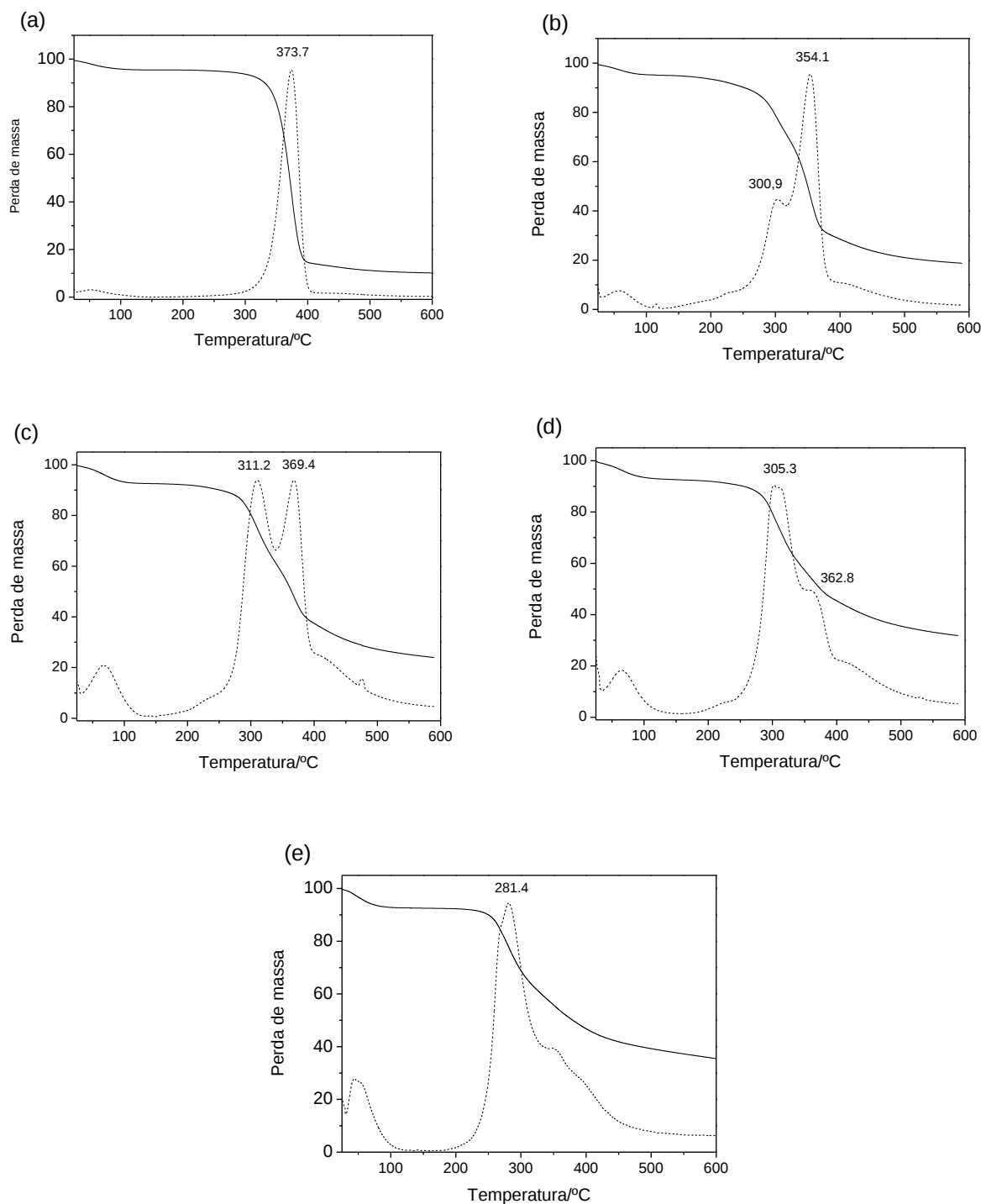
Em termos de comparação, foram feitas e incluídas imagens da CB pura e FB pura em um aumento de 5.000 x, e dos compósitos nos mesmos aumentos.

RESULTADO

a) Análise termogravimética

A Figura 14 ilustra os gráficos resultantes das análises para a CB e FB puros e também para os nanocompósitos de CB/FB.

Figura 14 - Curvas TG: (a) CB pura liofilizada, (b) compósito CB/FB (25% FB), (c) compósito CB/FB (50% FB), (d) compósito CB/FB (75% FB) (e) fibroína da seda (FB) pura. Araraquara, 2014.



A curva obtida para a CB pura liofilizada exibiu duas perdas de massa significativas (Figura 14a). A primeira, ocorreu até 200°C devido à evaporação de H₂O da superfície (~4,6%).

O segundo evento (280°C - 415°C) evidenciou uma elevada perda de massa (80%). Este, está associado à degradação térmica, relacionado com a despolimerização e a decomposição da celulose desidratada em gases (H_2O , CO e CO_2) (Barud et al.⁶, 2007)

A perda de massa inicial até 120°C da FB pura está relacionada com a perda de água (7,3%). O segundo evento que envolve a perda de massa de 52% (180-500°C), está associado com a decomposição dos grupos de cadeias laterais de resíduos de aminoácidos, bem como a clivagem de ligações peptídicas (Nogueira et al.⁷¹, 2009).

As curvas TG obtidas para os compósitos CB-FB apresentaram três perdas de massa e parecem ser uma composição dos eventos observados para a CB e FB individualmente (Figura 14). O primeiro evento revelou uma perda de massa contínua em torno de 7% (em torno de 200°C, aproximadamente) e está associado com a perda de água em todas as curvas referentes aos compósitos CB/FB. Em seguida, os dois grandes eventos na faixa de 200°C a 500°C estão presentes em todas as amostras dos compósitos, sendo que o primeiro deste evento evidenciou estar associado à decomposição da fibroína e o segundo refere-se à decomposição da CB.

A área relativa ao pico da curva TG é diretamente proporcional à variação de massa e pode ser usado para comparar os índices obtidos para cada compósito. O primeiro pico, relacionado com a decomposição da fibroína tornou-se mais intenso quando o conteúdo de fibroína aumentou nos nanocompósitos. A Figura 14c demonstrou alturas similares entre o primeiro e o segundo pico. Este fato é relevante, pois demonstrou que a proporção de CB/FB encontra-se em 50:50 neste compósito, sendo assim renomeado para CB/FB 50%.

Da mesma forma, a curva do compósito CB/FB 75% demonstrou grande similaridade com a curva TG da fibroína pura. A altura do primeiro pico (Figura 14d) que está associada com a decomposição da FB encontrou-se maior do que ao segundo pico, atribuído à decomposição da CB. Estes resultados estão de acordo com os encontrados pelas medidas gravimétricas que

determinaram as proporções 25:75 de biocelulose e fibroína neste nanocompósito, indicando, assim, uma maior participação de FB na composição do material desenvolvido.

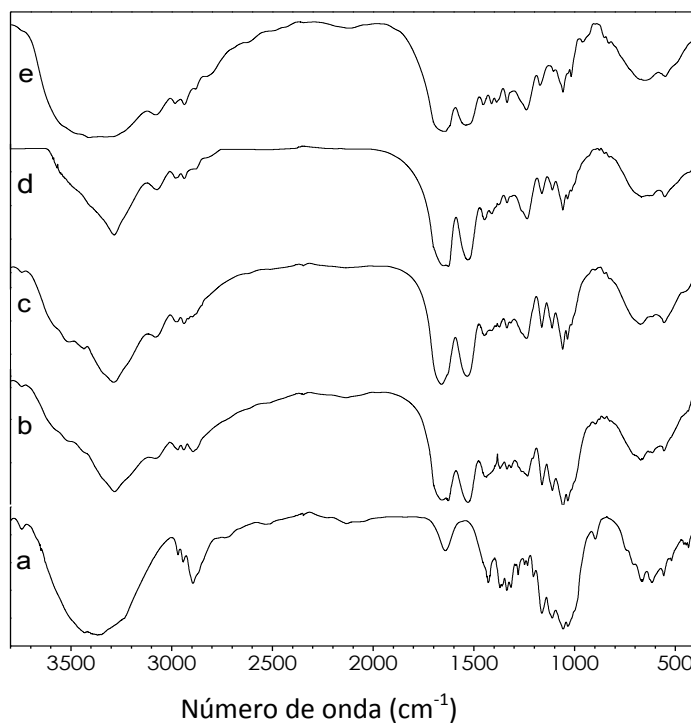
Os resultados da análise TG/DTA indicam que os eventos de decomposição ocorrem de maneira distinta, o que sugere fracas interações entre a CB e a FB.

Deste modo as porcentagens finais de FB nos compósitos foram determinados por meio desta técnica de caracterização. As amostras foram renomeadas de acordo com o conteúdo de FB: CB-FB 25%, CB-FB 50% e CB-FB 75%

b) Espectroscopia FT-IR

A Figura 15 ilustra os espectros obtidos ao se empregar esta técnica, de acordo com as especificações mencionadas anteriormente.

Figura 15 - Espectros FT-IR: (a) membrana CB pura liofilizada, (b) compósito CB/FB (25% FB), (c) compósito CB/FB (50% FB), (d) compósito CB/FB (75% FB) (e) fibroína da seda (FB) pura liofilizada. Araraquara, 2014.



As principais atribuições que caracterizam a CB, Figura 15(a), são: 3500 cm^{-1} - estiramento OH; 2900 cm^{-1} - estiramento CH e estiramento assimétrico CH_2 ; 2700 cm^{-1} - estiramento simétrico CH_2 ; 1640 cm^{-1} - deformação OH; 1400 cm^{-1} - deformação CH_2 ; 1370 cm^{-1} - deformação CH_3 ; 1340 cm^{-1} - deformação OH e $1320\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ - deformação CO (Sugiyama et al.⁹⁰, 1991).

A FB pura apresentou duas bandas características atribuídas à amida I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) e amida II ($1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) dos seus esqueletos peptídicos e são utilizadas para a análise de diferentes estruturas secundárias da FB. As bandas nas regiões de $1610\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ (amida I) e $1510\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$ (amida II) são características da estrutura secundária de seda II (β -folha), enquanto que as bandas em $1640\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ (amida I) e $1535\text{-}1542\text{ cm}^{-1}$ (amida II) são indicativas da seda I (forma α) (Lu et al.⁶⁵, 2001; Nazarov et al.⁷⁰, 2004). No presente estudo, a banda de amida I da FB liofilizada apareceu em 1647 cm^{-1} e 1537 cm^{-1} , correspondendo à seda I. No entanto, um ombro em 1620 cm^{-1} indicou a formação de uma porcentagem de seda II. Estas bandas não sofreram modificações nos compósitos, em relação à FB pura.

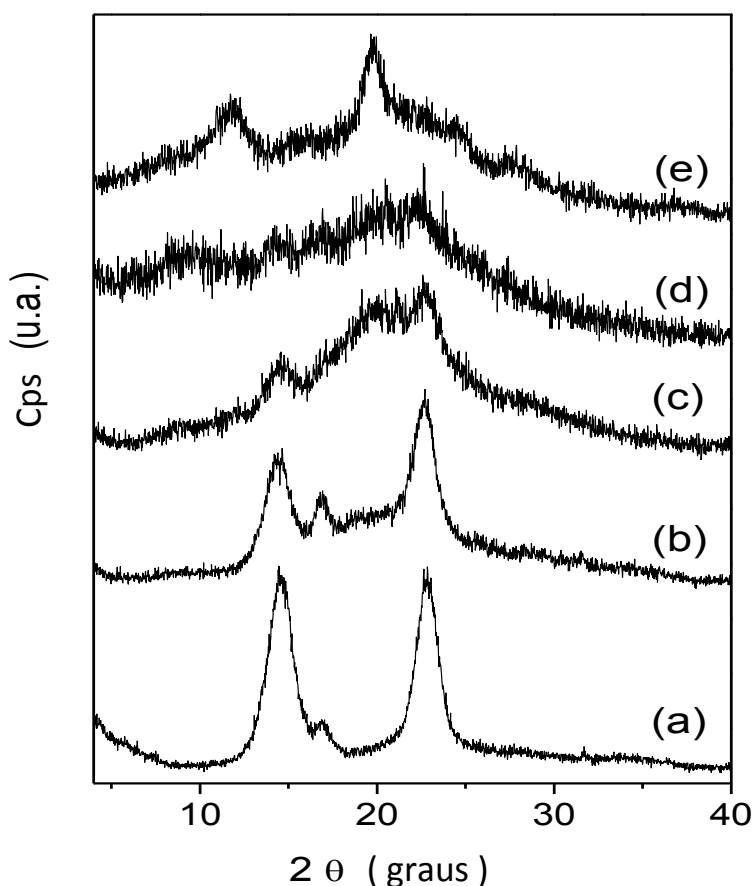
Nos espectros da FB e da CB, observou-se uma banda larga na região de 3400 cm^{-1} relacionada ao estiramento das ligações OH. Em contrapartida, as bandas de estiramento OH nos espectros dos compósitos apresentaram-se mais finas quando comparadas ao espectro da CB pura, sugerindo a ausência de ligações de hidrogênio com o OH.

Bandas de celulose na região $1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ foram observadas para os compósitos nas mesmas posições e intensidades relativas como na CB puro. Nenhuma alteração das bandas desta região pôde ser observada após a impregnação com a fibroína.

c) Difractometria de Raios-X

Foram obtidos os difratogramas de R-X para a BC, FB e os compósitos(25, 50 e 75%) (Figura 16). Picos de difração são observados a 15° e $22,5^\circ$ para a BC pura. Estes picos são relativos às distâncias interplanares características de celulose nativa do tipo I (Kim et al.⁵⁰, 2005). A FB liofilizada apresenta picos a $11,8^\circ$, $19,8^\circ$, $22,6^\circ$, $27,5^\circ$ correspondentes à sua fase I. Os padrões de difração da CB sobrepõem-se ao padrão da SF nos compósitos. Portanto, não é possível elucidar o tipo de estrutura secundária da SF (seda I ou seda II) nos compósitos.

Figura 16 - Difratogramas de Raios-X de: (a) membrana CB pura liofilizada, (b) compósito CB/FB (25% FB), (c) compósito CB/FB (50% FB), (d) compósito CB/FB (75% FB) (e) fibroína da seda (FB) pura. Araraquara, 2014.



d) Microscopia electronica de varredura (MEV):

A Figura 17 exhibe a estrutura da CB pura e da FB pura, respectivamente e a Figura 18 é relativa às imagens obtidas dos nanocompósitos na porcentagens 25, 50 e 75% de FB.

Estas imagens demonstram uma estrutura tridimensional porosa no qual as nanofibras de CB estão incorporadas na estrutura tridimensional da fibroína. O tamanho dos poros pode ser induzido de acordo com a proporção CB-FB.

A amostra de CB-FB contendo 50% de fibroína foi a que apresentou a melhor porosidade dentre as três amostras de compósitos preparadas. Neste ponto, a porosidade apresenta-se como uma propriedade de interesse na engenharia tecidual, pois favorece a adesão de células aos scaffolds (Bodin et al.¹³, 2010).

Figura 17 – Imagens obtidas de MEV num aumento de 5000 x, a) CB pura e b) FB pura. Araraquara, 2014.

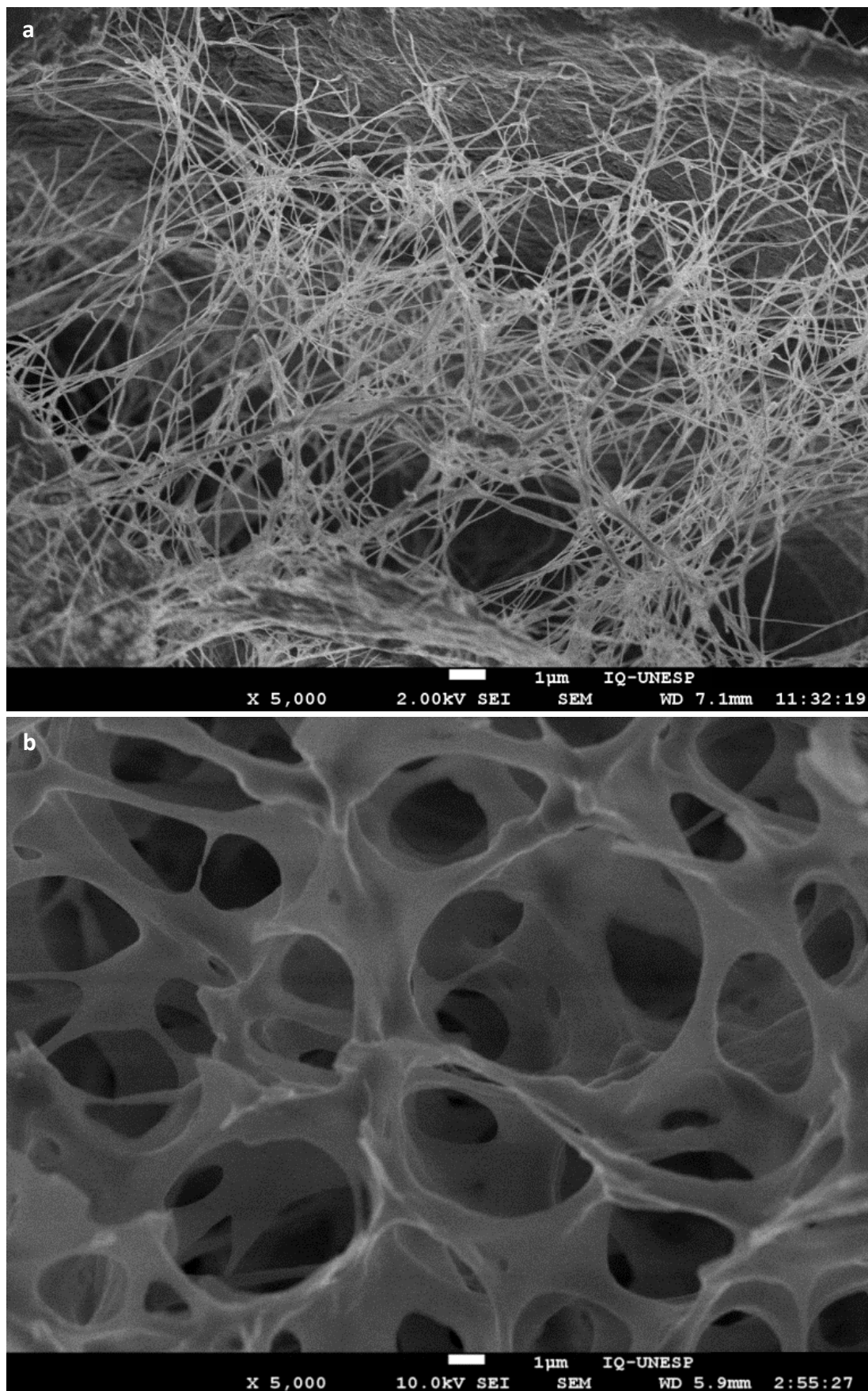
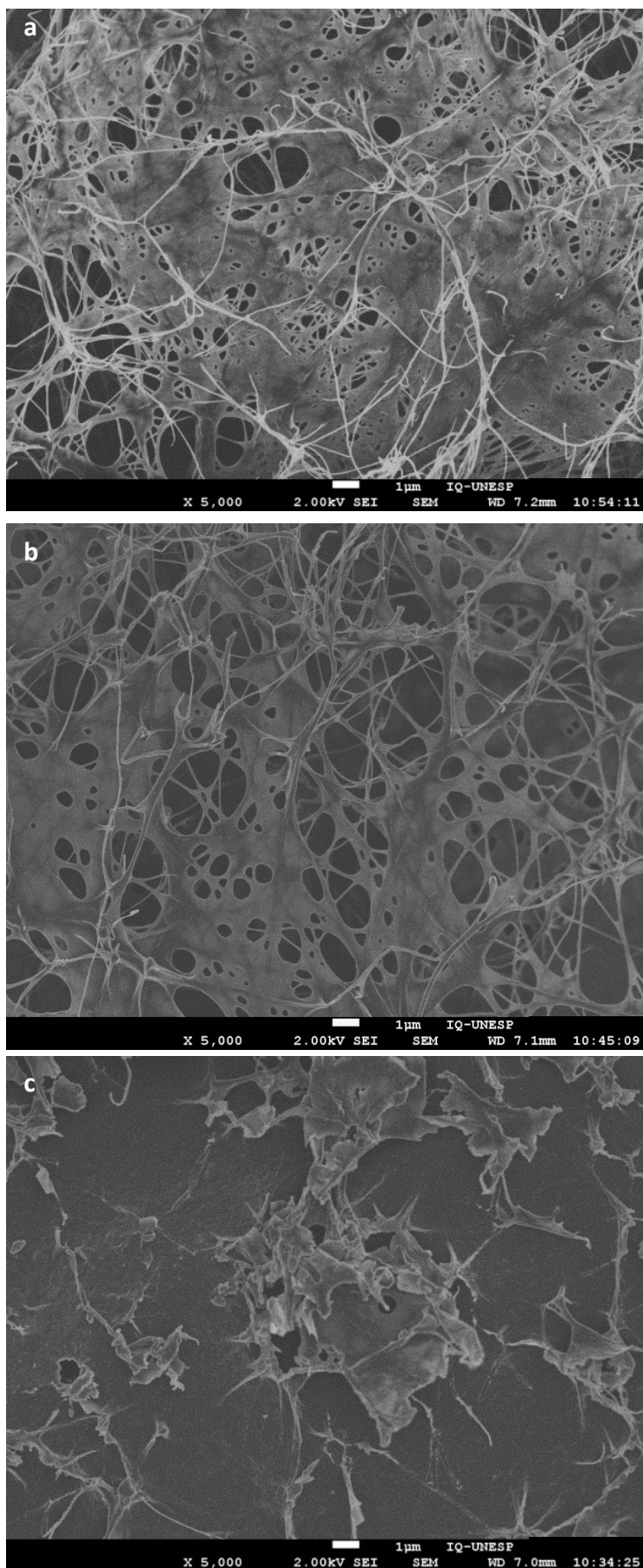


Figura 18 - a) Compósito de CB/FB a 25%; b) Compósito de CB/FB a 50%, c) Compósito de CB/FB a 75%. Araraquara, 2014.



4.3 ESTUDO DA CITOCOMPATIBILIDADE DO NANOCOMPÓSITO CB/FB

50%

MATERIAL E MÉTODO

Após a análise dos resultados de caracterização dos compósitos, empregou-se apenas o biomaterial desenvolvido na concentração de CB/FB 50% nestes ensaios, pois foi o que apresentou o melhor desempenho físico-químico, no que tange aos parâmetros avaliados.

No presente estudo as análises *in vitro* realizadas foram: MTT, azul de tripano, bem como adesão e proliferação celular. Estas foram realizadas em cooperação com o Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz, Salvador-BA, sob a supervisão da Dra. Camila Indiani e Dra. Valéria de Matos Borges, com o auxílio da aluna de mestrado Fabiana Celes.

As análises de citotoxicidade, são de grande importância, pois fornecem dados sobre a ação da substância testada e as possíveis reações aos tecidos. A citotoxicidade pode ser avaliada por diferentes métodos de acordo com o dano celular ocorrido: alterações nas membranas plasmáticas (podem ser avaliadas por meio de corantes como o azul de tripano), alterações nas funções metabólicas das mitocôndrias, que pode ser mensurado por um método colorimétrico, como o MTT (tetrazólio de 3 - (4,5 - dimetiltiazol -2-il) -2,5-difenil tetrazólio brometo) (Kim et al.⁵¹, 2009).

Deste modo, o ensaio de citotoxicidade requer uma seleção do método baseado na adequação da célula empregada nos testes. O presente estudo utilizou as células L929 para os testes de MTT e também para os demais testes, o que está de acordo as normas ISO 10993-5:2009⁴⁵, que baliza os testes *in vitro* de citotoxicidade

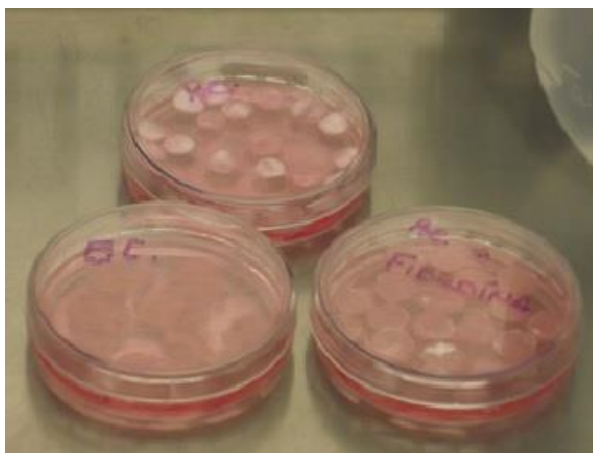
para dispositivos biomédicos. Os testes foram feitos por meio de três repetições independentes.

Para cada ensaio *in vitro*, foram estabelecidas as seguintes hipóteses: H0: O material desenvolvido responde de maneira semelhante ao controle *Scaffold* de CB pura e H1: O material desenvolvido responde de maneira diferente do controle *Scaffold* de CB pura. Para estes ensaios, o teste estatístico empregado foi o de Kruskal Wallis (pois os dados não são paramétricos) empregado o programa estatístico Graph Pad Prism 5.0.

4.3.1 Preparo do material

Os *scaffolds* dos materiais testados foram preparados sendo imersos em meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM - Invitrogen) na quantidade suficiente para cobrir as superfícies dos mesmos, em placas de petri e foram deixados no fluxo por 1h (Figura 19).

Figura 19 - Tratamento inicial do material no meio DMEM (reidratação). Araraquara, 2014.



4.3.2 MTT (Roche Molecular Biochemicals)

Este teste baseia-se na metabolização do MTT pelas mitocôndrias de células viáveis, que irá liberar a enzima succinato desidrogenase, capaz de converter o sal do tetrazolium, de cor amarelada em cristais de Formazan, de cor azul escura/ roxa. O sal de tetrazolium é insolúvel em solução aquosa e pode ser solubilizado em substâncias como o Dimetilsulfóxido (DMSO – $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) ou Duodecilsulfato de sódio (SDS) e quantificado usando um espectrofotômetro. A quantidade de células viáveis correlaciona-se diretamente com a quantidade de formazan formado.

Neste teste, em fluxo laminar, foram semeadas 5.000 ($5 \cdot 10^3$) células L929 em placas de 48 poços num volume de 500 μL de meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM - InvitrogenTM) suplementado com 10% de SFB e 100 U/mL penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ estreptomicina. As placas com as células foram e incubadas a 37°C em estufa de 5% de CO_2 , por 1 h.

Na sequência, foi retirada a placa de 48 poços da estufa já com as células e foi colocado um disco de aproximadamente 0,8 cm de diâmetro de cada biomaterial em cada poço, além do controle negativo (CN = sem biomaterial) e do controle positivo (CP) (metanol), levando novamente para serem incubadas a 37°C em estufa de 5% de CO_2 , por 48h. Todos os tratamentos, os CN e CP foram realizados em quintuplicata e em condições de esterilidade (Figuras 20 e 21).

Figura 20 – Esquema da colocação dos materiais para a realização do teste. Araraquara, 2014.

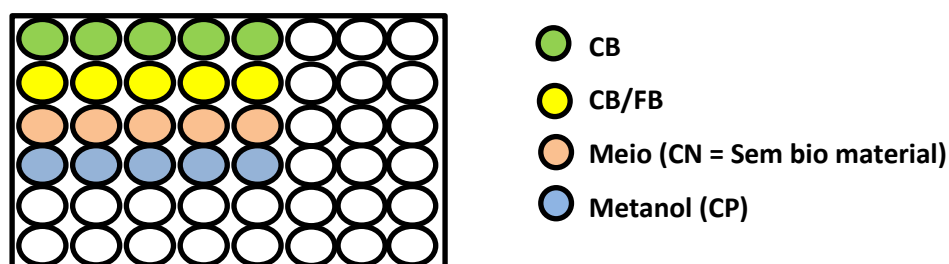
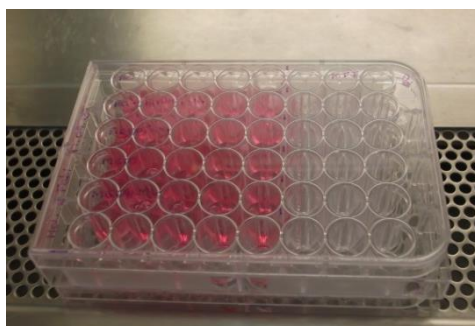
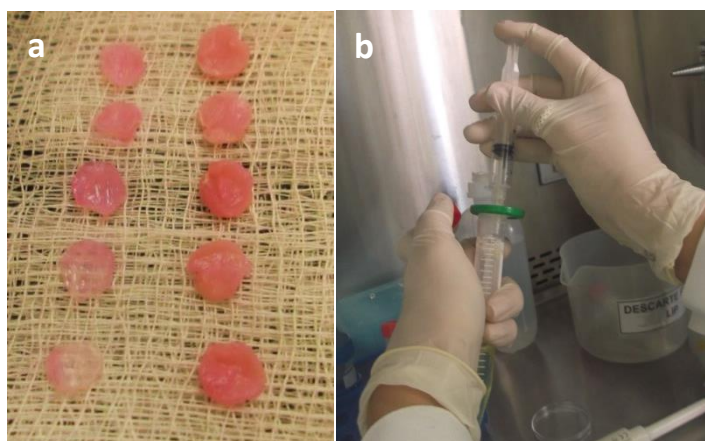


Figura 21 - Placa de 48 poços preparada para o teste de MTT, em quintuplicata. Araraquara, 2014.



Ao final do período de incubação, os biomateriais foram removidos de cada poço e as culturas foram lavadas com 250 μ l de soro fisiológico. A luz do fluxo foi apagada e foi colocado em cada poço 200 μ l de meio DEMEN (Invitrogen™) com solução MTT (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) na concentração final de 500 μ g/ml por poço deixando a 37°C na estufa por um tempo de incubação (tratamento) de 4h (Figura 22).

Figura 22 - a) Scaffolds removidos dos poços após incubação e b) Filtragem do tetrazolium para ser inserido nas culturas. Araraquara, 2014.



Em seguida, foi realizada a leitura colorimétrica em espectrofotômetro Espectra Max 190 (Molecular Devices) em 570 nm e 690 nm, cujo resultado é uma

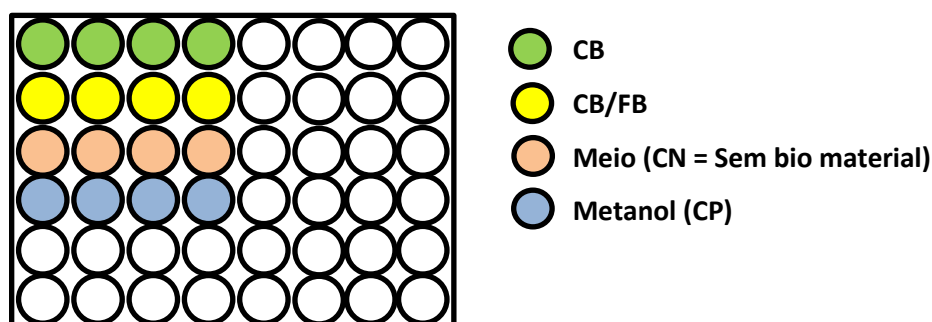
medida de Densidade Óptica (DO). Quanto mais escura a coloração, maior a metabolização do MTT, consequentemente, maior a DO, e menos citotóxico é o material testado.

4.3.3 Ensaio de Citotoxicidade por meio do Azul de Tripiano

A mesma metodologia do MTT foi empregada para o azul de Tripiano. Contudo, este teste foi realizado em quadruplicata (Figura 23) e a porcentagem de células viáveis foi determinada contando-se 200 células em pelo menos 5 campos aleatórios no microscópio de luz invertida na presença do azul de tripiano ($\cong 50 \mu\text{l}$). O Azul de Tripiano age evidenciando as células vivas das mortas, pois a membrana citoplasmática das células mortas se rompem, permitindo a entrada deste líquido, corando as mesmas de azul. O teste foi feito em quadruplicata.

Figura 23 – Esquema demonstrando o teste do azul de tripiano, em quadruplicata.

Araraquara, 2014.



4.3.4 Ensaio de Adesão, Proliferação e Viabilidade celular

Foram semeadas 5.000 ($5 \cdot 10^3$) células L929 em placas de 48 poços num volume de 500 μl de meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM - InvitrogenTM) suplementado com 10% de SFB e 100 U/mL penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ estreptomicina. As células foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO_2 . Foram realizados os

tratamentos nos seguintes tempos experimentais: 16, 24, 48 e 72 horas, colocando-se um disco de aproximadamente 0,8 cm de diâmetro de cada biomaterial nos poços para permanecerem em contato com as células.

Após os respectivos tempos, as células foram removidas dos poços com trypsin-EDTA 0,25% V/V (GIBCO), centrifugadas a 1300 g 4⁰C por 10 minutos e em seguida resuspensas em 20 µl de azul de tripano e contadas em uma câmara hemocitométrica de Neubauer (NewOptic). Todos os tratamentos foram realizados em quadruplicata (Figuras 24 e 25).

Figura 24 - Esquema adotado para o teste de proliferação celular. Araraquara, 2014.

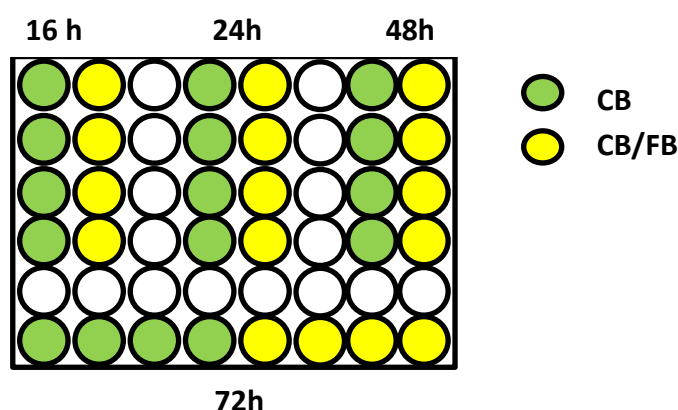
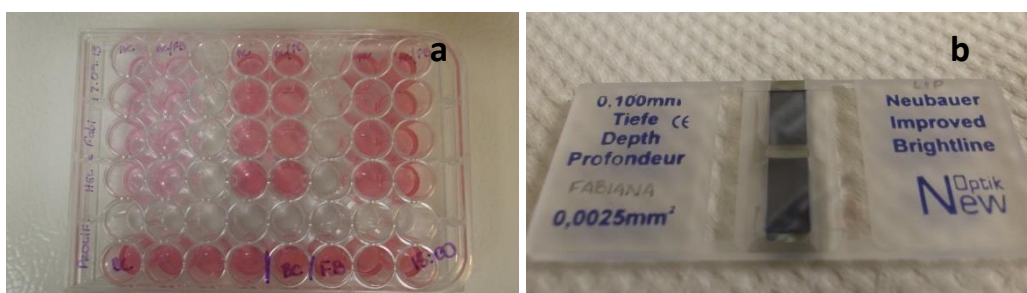


Figura 25 - a) Placa de 48 poços com as células e b) câmara de Neubauer. Araraquara, 2014.



4.3.5 Avaliação por meio de MEV da face superficial do *scaffold*

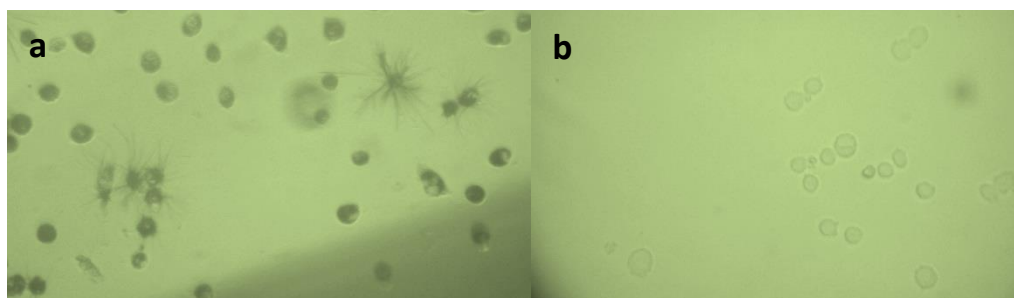
Os *scaffolds* referentes ao tempo de 48 horas receberam tratamento de uma solução de glutaraldeído grau II a 2.5%, formaldeído 2%, e 2.5 mM CaCl_2 em 0.1 M de solução tampão de cacodilato de sódio (pH 7) para fixar as células. Após este procedimento, as amostras foram preparadas com carbono em pó sobre a superfície para serem avaliadas quanto à adesão celular após 48 horas.

RESULTADO

a) MTT (Roche Molecular Biochemicals)

Ao final do tratamento, os biomateriais foram removidos dos poços e a Figura 26 demonstra o aspecto das células viáveis após o contato com o sal do MTT (para termos de ilustração) e do controle negativo em contato com o metanol, visualizado em microscópio óptico de luz invertida, em um aumento de 40x.

Figura 26 – Imagem obtida empregando-se microscópio de luz invertida do aspecto das células em contato com o sal tetrazolium do MTT a) células viáveis e b) metanol, como controle negativo. Araraquara, 2014.



A leitura colorimétrica foi feita, de acordo com a metodologia descrita. Os resultados obtidos estão expressos nas Tabelas 5, 6 e Gráfico 1.

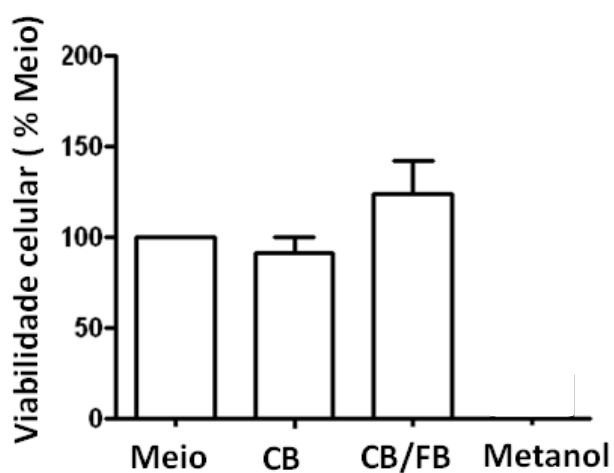
Tabela 5 - Valores obtidos na leitura da densidade óptica (DO) para o teste de viabilidade, empregando o MTT. Araraquara, 2014.

amostra	Medium (A)	BC (B)	BC/SF (C)	Methanol (D)
1	0,057	0,038	0,047	0,0
2	0,047	0,045	0,060	0,0
3	0,064	0,049	0,055	0,0
4	0,047	0,049	0,067	0,0
5	0,046	0,052	0,083	0,0

Tabela 6 - Viabilidade por MTT (grupo/meio), expressa em porcentagem (%).Araraquara, 2014.

amostra	100 (A / A)	100 (B / A)	100 (C / A)	100 (D / A)
1	100	66,67	82,46	0
2	100	95,74	127,66	0
3	100	76,56	85,94	0
4	100	104,26	142,55	0
5	100	113,04	180,43	0

Gráfico 1 - Viabilidade por MTT (grupo/meio), expressa em porcentagem (%). Araraquara, 2014.



De acordo com os resultados obtidos, os grupos B e C não apresentam citotoxicidade, pois as médias de viabilidade celular encontram-se acima 70%

($\mu_B=91,25\%$ e $\mu_C=123,81\%$, respectivamente), conforme ditam os padrões da ISO 10993-5:2009⁴⁵.

Contudo, não encontrou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos testados, ($p = 0,43$). Ou seja, deve-se aceitar a H_0 formulada: o nanocompósito (CB/FB 50%) responde de maneira igual aos outros grupos comparados, apesar de sua média de viabilidade ($\mu_C=123,81\%$) apresentar-se maior do que a média obtida para o grupo CB pura ($\mu_B=91,25\%$).

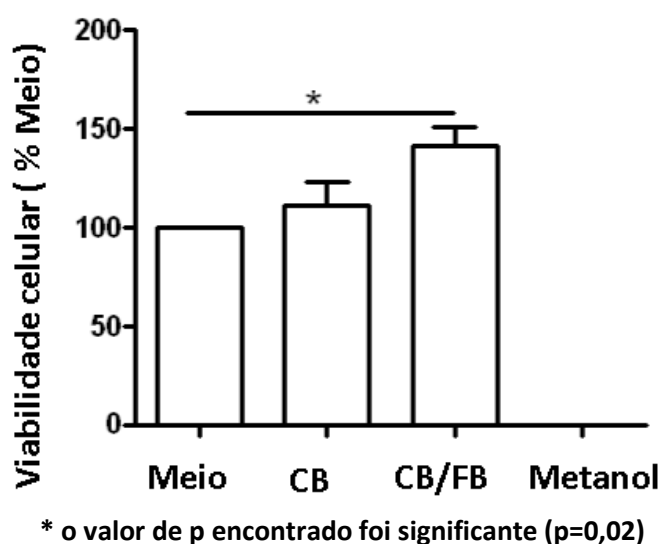
b) Ensaio de citotoxicidade por meio do Azul de tripano

Os resultados estão descritos abaixo, na Tabela 7 e Gráfico 2.

Tabela 7 - Média de células vivas (em 200) contadas em microscópio de luz invertida, em 5 campos aleatórios. Araraquara, 2014.

amostra	Meio	CB	CB/FB	Metanol
1	145	122	185	0
2	146	153	189	0
3	107	151	180	0
4	126	144	179	0

Gráfico 2 - Viabilidade do Azul de tripano expressos em porcentagem (%). Araraquara, 2014.



Para estes ensaios, o teste estatístico aplicado também foi o de Kruskal Wallis e foi feito o pós teste de Dunns para comparar os grupos, empregando o programa estatístico Graph Pad Prism 5.0. Deste modo, encontrou-se diferença estatisticamente significativa apontando para o grupo CB/FB, no valor de $p=0,02$.

c) Ensaio de adesão e proliferação celular

Os resultados obtidos estão expressos nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Contagem de células após os tempos definidos 16, 24, 48 e 72h, usando câmara hemocitométrica de Neubauer, expressos em nº células/ml, para CB e CB/FB. Araraquara, 2014.

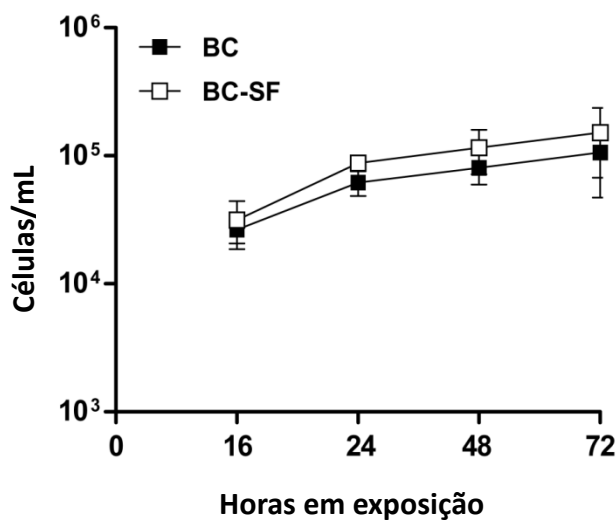
amostra	CB 16h	CB/FB 16h	CB 24h	CB/FB 24h	CB 48h	CB/FB 48h	CB 72h	CB/FB 72h
1	17000	69000	76000	109000	73000	76000	74000	398000
2	16000	16000	88000	70000	86000	55000	32000	48000
3	36000	27000	26000	97000	31000	247000	38000	36000
4	37000	14000	58000	75000	133000	86000	281000	125000

Tabela 9 - Médias e erro padrão das amostras de CB e CB/FB. Araraquara, 2014.

	Média (CB)	Desvio padrão (CB)	Média (CB/FB)	desvio padrão (CB/FB)
16h	26500	5781	31500	12823
24h	62000	13491	87750	9196
48h	80750	21001	116000	44142
72h	106250	58984	151750	84418

À partir destes valores obtidos, foi gerado o Gráfico 3:

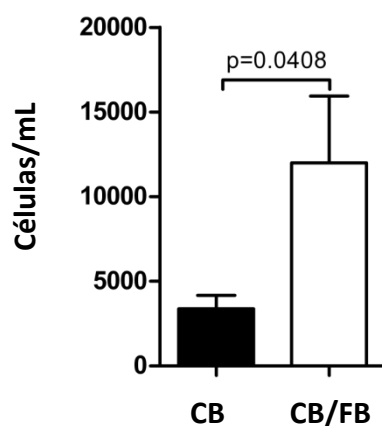
Gráfico 3 - Média e desvio padrão em relação aos valores obtidos para a proliferação celular nos tempos definidos 16, 24, 48 e 72h, para CB e CB/FB. Araraquara, 2014.



Para estes ensaios, foi empregado o teste Mann Whitney, que é um teste não paramétrico de comparação entre as médias calculadas empregando o programa estatístico Graph Pad Prism 5.0. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos $p < 0,05$ ($p = 0,07$).

A hipótese de que a fibroína aumenta a adesão celular nos *scaffolds* de celulose foi testada. Células L-929 foram semeadas sobre CB pura e nos compósitos CB-FB e permaneceram incubadas por 48h. Após aplicar o teste estatístico Mann Whitney, empregando o programa estatístico Graph Pad Prism 5.0, foi encontrado um valor de $p < 0,05$. O Gráfico 4 demonstra os resultados obtidos.

Gráfico 4 - Gráfico quantitativo da adesão celular (células L-929) após semeadura sobre os materiais CB e CB-FB 50%. Após 48h, as células foram suspensas e contadas em uma câmara de Newbawer. Cada barra representa a média $\pm$ SEM de 3 repetições e é obtida a partir de duas experiências independentes (* $p=0,04$). Araraquara, 2014.

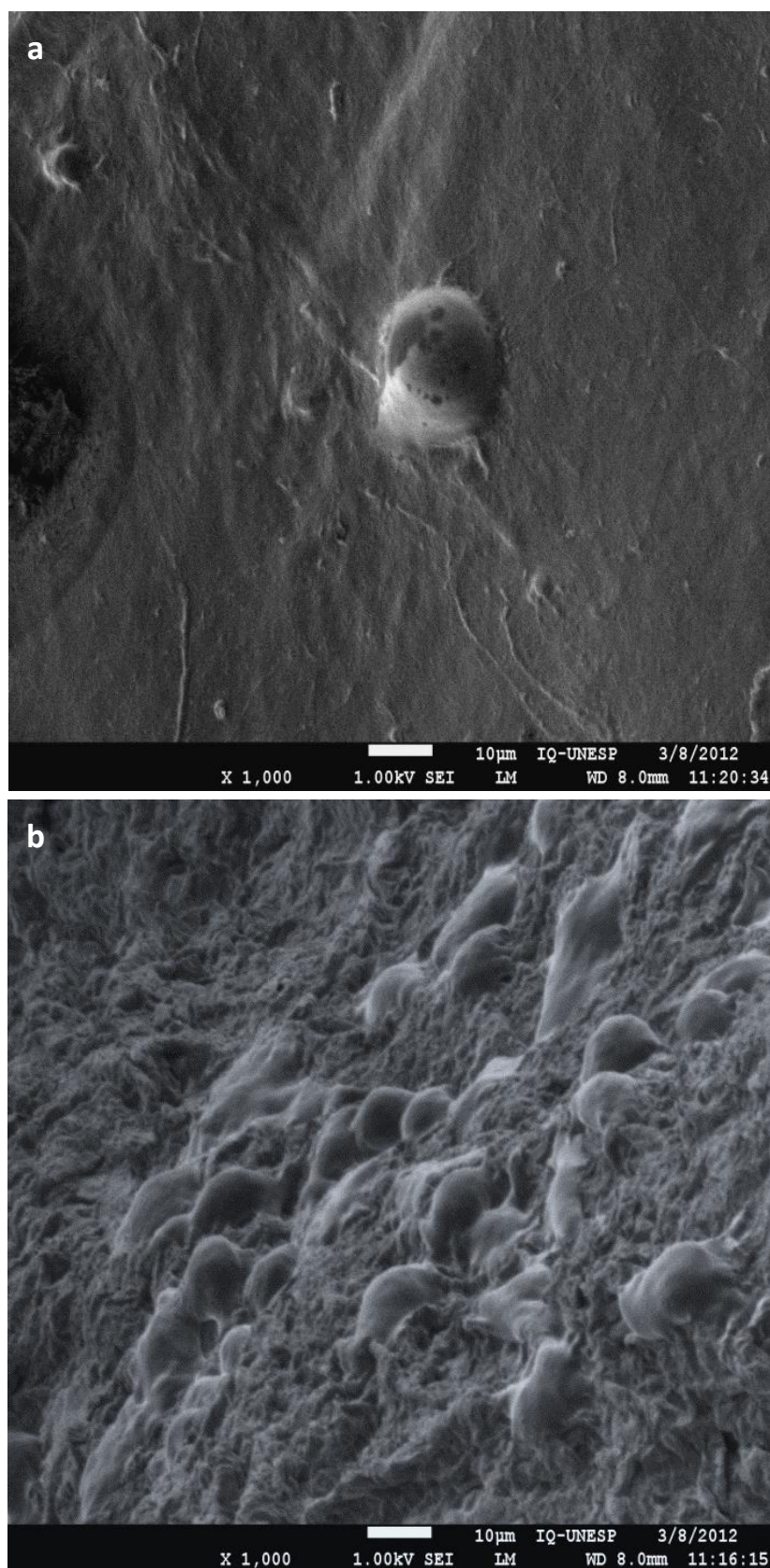


d) Avaliação por meio do MEV da superfície do *scaffold*

Os *scaffolds* utilizados para o ensaio de adesão descrito acima, foram fixados, conforme descrito na metodologia, e a superfície foi avaliada por meio de imagens de MEV (Figura 27).

Nestas imagens é possível visualizar um número muito maior de células aderidas ao *scaffold* CB-FB. As células apresentam um formato mais estrelado, apresentando pseudópodos como se estivesse se esticando. Este fato é interessante pois indica que as células estão aderindo e proliferando sobre os *scaffold*. Já nas imagens relativas aos *scaffolds* de CB pura, as células mantêm um formato mais arredondado, indicando pouca adesão e proliferação celular. Estes dados sugerem que o compósito CB-FB exibe uma melhor biocompatibilidade em comparação à CB puro, devido à presença da FB, que possivelmente induziu um aumento significativo na adesão de fibroblastos L929 no compósito CB-FB 50% em relação à celulose pura.

Figura 27 - Imagens de MEV após a adesão das células L-929 por 48 h, em a) CB pura e b) do compósito CB-FB 50%. Araraquara, 2014.





Discussão

5 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi o de desenvolver um biomaterial para reparação tecidual almejando aplicações em odontologia (em tecido gengival, mucoso, pulpar e ósseo).

Idealmente, um biomaterial deve apresentar as seguintes características: ser biocompatível, isto é, não induzir a respostas teciduais ou imunológicas adversas; não ser tóxico ou carcinogênico; ser quimicamente projetado para suas funções de uso; possuir estabilidade mecânica, peso e densidade ao seu adequados uso; ser esterelizável; ter custo relativamente baixo; ser reprodutível e de fácil fabricação e estimular reações biológicas favoráveis em relação a sua função de uso (Williams⁹⁸, 2009).

Sobre a resistência mecânica, autores afirmam que a CB apresente esta propriedade com excelência (Klemm et al.⁵⁵, 2005) e que o desenvolvimento de compósitos baseados em CB são governados pela natureza de reforçá-los de acordo com a aplicação desejada, no intuito de superar as suas limitações e ampliar as propriedades da CB pura (Shah⁸⁴, 2013).

As limitações apresentadas pela CB são conhecidas: ela não é facilmente absorvível e também, ao ser excretada pela bactéria *Glucanoacetobacter xylinum* forma uma densa rede de fibras, o que pode impedir ou diminuir a adesão celular (Backdahl et al.⁴, 2006) além de não possuir propriedades antibacterianas, apenas funcionar como uma barreira física contra infecções (Czaja et al.²⁴, 2007). Neste ponto, a fibroína apresenta efeito antimicrobiano (Li et al.⁶³, 2001) o que poderia agregar mais aplicações e propriedades aos scaffolds de CB/FB concebidos.

Sobre a biodegradabilidade, autores sugerem que a CB apresenta tais propriedades, sendo altamente absorvível (Czaja et al.²⁴, 2007; Williams⁹⁸, 2009).

Contudo, este processo de degradação da celulose geralmente ocorre na sua forma mais rústica na natureza, por meio de enzimólise, e não no corpo humano onde estas enzimas que degradam a celulose não estão presentes (Hu, Catchmark⁴²⁻⁴³, 2011). Assim, a adição de fibroína contribuiria neste quesito para a fabricação de dispositivos bioabsorvíveis, pois esta apresenta um controle de biodegradabilidade sendo altamente absorvível (Ge et al.³⁴, 2012). Esta biodegradabilidade é desejável, já que o ideal é que o material implantado degrade aos poucos, à medida que o novo tecido vai sendo substituído.

Quanto à adesão celular aos dispositivos biomédicos, ela pode ser melhorada empregando-se sequências de aminoácidos tais como Arg-Gly-Asp (RGD), encontrado em diversas matrizes extracelulares (Fu et al.³³, 2013). A literatura demonstra que a fibroína, uma proteína natural, apresenta estes aminoácidos alcalinos que são conhecidos por serem receptores celulares e mediar importantes interações entre células de mamíferos e a matrix extra-celular (MEC), facilitando a adesão e crescimento celular (Fang et al.³¹, 2009). Este fato corrobora com os achados do estudo realizado ao se examinar as imagens obtidas por meio do MEV, onde é possível visualizar uma maior número de células aderidas aos scaffolds de CB/FB50% quando comparados aos de CB pura (Figura 27).

Outros autores ainda relatam que estes tipos de proteínas exibem ótimas propriedades mecânicas e que combinadas com a biocompatibilidade, oferecem uma importante opção no campo de liberação controlada e engenharia tecidual (Nogueira et al.⁷¹, 2009). Deste modo, a adição de FB à CB poderia também conferir estas propriedades ao material concebido neste estudo, indicando a necessidade de outros estudos específicos para tanto o que não configurou o objetivo desta pesquisa.

Além desta biocompatibilidade tecidual a quase todos os tipos de células (Altman et al.¹, 2003; Fang et al.³¹, 2009), a fibroína ainda apresenta propriedades antitrombogênicas (Ge et al.³⁴, 2012), evitando que sejam formados trombos, ou agregações plaquetárias no interior dos vasos sanguíneos. Assim, diversos estudos visando o uso deste material como *scaffolds* na desafiante reconstrução de vasos de calibres inferiores a 5mm tem sido realizados, tanto in vivo quanto in vitro (Marelli et al.⁶⁸, 2010; Yang et al.¹⁰⁰, 2009; Enomoto et al.²⁸, 2010; Unger et al.⁹³, 2010; Patra et al.⁷³, 2012).

No que tange a extração da fibroína, todo o processo seguido encontra-se citado na metodologia deste trabalho (Rocwood et al.⁷⁷, 2011). Este procedimento faz-se necessário pois as fibras da seda são compostas por 2 tipos de proteína: a sericina e a fibroína. A sericina é a proteína que parece uma “cola” unindo as fibras da seda e proporcionando a estruturação do casulo. Contudo ela é a responsável pela reação tecidual que as primeiras suturas feitas à base de fios de seda provocavam (Altman et al.¹, 2003). De modo, deve-se remover a sericina dos casulos do bicho-da-seda, sendo esta desprezada no processo, para permanecer apenas com a fibroína.

Quanto a rotina de obtenção e características das mantas de CB pudemos observar que a sua produção é relativamente fácil e reprodutível. Contudo, o processo de biofabricação da celulose bacteriana pode ser manipulado de forma a alterar a estrutura e qualidade da mesma, principalmente quanto à fonte de carbono e os aditivos do meio de cultura (Klemm et al.⁵⁵, 2005). Devido a este fator, o estudo morfológico da CB pura foi conduzido para averiguar a uniformidade das mantas, o que pode influenciar na padronização do biomaterial a ser produzido.

As mantas obtidas neste estudo obedeceram ao padrão de espessura de 95,05 mm de diâmetro e 1,6 mm em média para a manta úmida em 96 horas de crescimento, apresentando 2,25% de massa seca e produção de 1,13g/L, e ainda, em torno de 99% de água, de acordo com Barud et al.⁹ (2011). Através da análise dos parâmetros avaliados, todos estão coerentes com os dados dos Laboratórios de Materiais Fotônicos (LAMF) em que a CB foi produzida. E para manter a padronização do material, utilizou-se o perfurador pré-fabricado de diâmetro de 8 mm para perfurar as mantas uniformemente.

Então, procedeu-se com a caracterização do material em todas as concentrações obtidas: 25%, 50% e 75% de FB. Os achados foram preliminarmente discutidos juntamente com a exposição dos resultados, de maneira individual nos tópicos de cada técnica. Contudo, de uma forma geral, a adição de fibroína à CB não alterou as características desta.

As imagens obtidas por meio do MEV demonstram que foi possível observar distintamente as fibras da celulose e da fibroína, fato que caracteriza um compósito. Também verificou-se que o material conservou a porosidade, característica importante para promover a adesão e crescimento celular (Figura 18). E no compósito de 75% de FB, esta recobriu quase que totalmente as fibras da CB, parecendo uma massa, obliterando os poros totalmente.

Neste ponto vale a pena ressaltar que os benefícios da fibroína quanto à melhora na adesão celular, devido às suas características protéicas, são desejáveis. Contudo, na concentração de 75%, há nitidamente uma diminuição dos poros, indicando que a fibroína pode influenciar no controle do diâmetro destes. Ou seja, não é apenas a quantidade ou qualidade de uma substância adicionada à CB que irá melhorar a adesão

celular, mas também a arquitetura destes *scaffolds*. Estudos (Bodin et al.¹³, 2010) demonstraram que a porosidade induzida em *scaffolds* de CB pura melhorou a adesão de células tronco derivadas do sistema urinário.

A análise dos espectros obtidos pela espectroscopia FTIR (figura 15) revelou que não ocorreram ligações covalentes entre os dois materiais (FB e CB), apenas pontes de hidrogênio, e que tanto as bandas características da celulose quanto da fibroína estão presentes nas regiões típicas e esperadas, não sofrendo modificações. Este fato ressalta o observado nas imagens obtidas por meio do MEV, que não foi produzido um novo material e sim um compósito, onde é possível observar os dois materiais distintamente.

A difratometria de Raios-X indicou uma pequena alteração da cristalinidade, com a adição da FB, deixando o material com características um pouco mais amorfas. Contudo, o fato de o material ter perdido um pouco da transparência não afetará a aplicação em regeneração tecidual para o qual foi concebido.

Em relação à análise térmica (TGA-TG), a fibroína degrada em uma temperatura menor do que a celulose, sendo esta mais resistente ao calor. Contudo, nos compósitos com a celulose, a temperatura de degradação da fibroína foi influenciada pela presença da celulose, e aumentou em torno de 24,4°C, em média. Estes resultados evidenciados pela TGA-TG em relação à resistência à degradação indicam que o material suporta altas temperaturas e são fundamentais pois, visando aplicações futuras dos dispositivos desenvolvidos neste estudo na área biomédica e odontológica, faz-se necessária a esterelização efetiva do material.

Deste modo, um estudo de 2013 realizado por George et al.³⁵ compara 3 métodos de esterelização para os *scaffolds* baseados em fibroína: imersão em álcool

70% por 1 hora, em autoclave a 134 °C e 216 kPa por 12 minutos e radiação-gamma na dose de 15 KGy. Após a esterilização, as amostras foram submetidas a testes físicos, mecânicos e químicos, além de verificar se houve qualquer influência na adesão de células provenientes da córnea humana. Os compósitos de CB/FB desenvolvidos neste estudo suportariam a temperatura da autoclave de 134°C sem degradar pois as curvas TGA-TG indicam picos de degradação à partir de 280°C para a FB pura e 373,7°C para a CB pura desenvolvido, permanecendo os valores dos compósitos entre estes. Entretanto, os resultados encontrados pelos pesquisadores (George et al.³⁵, 2013) sugerem que método com o melhor desempenho, que causou menor dano e alteração nos materiais foi o de raios gamma.

De maneira semelhante, Hofmann et al.³⁹ (2014) também testaram métodos de esterilização para scaffolds baseados em FB. Além dos métodos comparados no estudo citado anteriormente, esta pesquisa também avaliou o desempenho da autoclave seca, sob aquecimento de 180°C, Óxido de Etileno e spray antibiótico antisséptico. As amostras também foram caracterizadas estruturalmente, avaliadas por meio de micro-CT e também quanto a adesão de células tronco mesenquimais. Os resultados indicaram que nenhum método alterou ou impediu a adesão celular. Contudo, se as propriedades mecânicas forem fundamentais para a aplicação a que o material for destinado, dentre os métodos testados, os autores recomendam que os scaffolds sejam autoclavados.

Entretanto, o estudo de Hoffman et al.³⁹ (2014) não incluiu a radiação-gamma dentre os métodos comparados, apesar de indicar que o melhor foi a autoclave, tanto a úmida quanto a seca. Já o estudo conduzido por George et al.³⁵ (2013), que dentre os métodos testados empregou a autoclave e a radiação gamma, indicou que o método mais efetivo foi o de radiação gamma.

Assim, no presente estudo, as amostras foram submetidas a doses de raios gama na ordem de 25K Gy, conforme descrito em material e métodos, pois este é o padrão que a empresa Embrarad (Cotia- SP) adota e a literatura demonstra a eficácia, confiabilidade e reprodutibilidade do método. Ademais, foi demonstrado em um estudo (Stoica-Guzun et al.⁸⁹, 2013) que independente das diversas doses de radiação-gamma (5, 10, 20 e 50 K Gy) aplicadas em compósitos de CB e álcool polivinílico (PVA) na forma de filmes, observou-se que o material não sofreu alterações estruturais ou mesmo perda das propriedades poderiam comprometer os ensaios de adesão e citotoxicidade subsequentes.

Quanto as diferentes concentrações de FB adicionadas à CB (25, 50 e 75%), observamos que o compósito de CB/FB 25% apresentou suas características muito mais semelhantes à CB, o que não agregaria muito em termos das propriedades da FB à CB. Quanto ao compósito CB/FB 75% este apresentou-se bastante amorfo, o pico relativo à grande primeira perda de massa muito inferior à temperatura de degradação da CB pura: 305,3°C e 373,7°C, respectivamente (Figura 14). Adicionalmente, o MEV revelou uma grande perda da porosidade apresentando a superfície da CB completamente obliterada pela FB nesta concentração de 75%, o que poderia interferir na adesão celular.

Deste modo, após a análise dos vários aspectos observados na caracterização físico-química dos materiais, o compósito de CB/FB50% foi o que apresentou conjuntamente as melhores características. Então, optou-se empregar apenas esta concentração, dentre os compósitos desenvolvidos, nos estudos de citotoxicidade subsequentes.

E, para que o desempenho em relação aos parâmetros avaliados (adesão, proliferação celular e citotoxicidade) destes ensaios sejam corretamente aplicados, fez-se

necessário fabricar *scaffolds* de CB pura, que apresentem arquitetura e dimensões semelhantes às do compósito desenvolvido, para que sejam usados como padrão de comparação, já que seu comportamento e propriedades biológicas são conhecidos e amplamente descritos na literatura (Cai, Kim¹⁷, 2010; Kim et al.⁵²⁻⁵⁴, 2010, 2011, 2013).

A citotoxicidade pode ser avaliada por diferentes métodos de acordo com o dano celular ocorrido: alterações nas membranas plasmáticas (podem ser avaliadas por meio de corantes como o azul de tripano), alterações nas funções metabólicas das mitocôndrias, que pode ser mensurado por um método colorimétrico, como o MTT (tetrazólio de 3 - (4,5 - dimetiliazol -2-il) -2,5-difenil tetrazólio brometo) (Kim et al.⁵¹, 2009).

Deste modo, o ensaio de citotoxicidade requer uma selecção do método baseado na adequação da célula empregada nos testes. O presente estudo utilizou as células L929 para os testes de MTT, o que está de acordo as normas ISO 10993-5:2009⁴⁵, que baliza os testes in vitro de citotoxicidade para dispositivos biomédicos.

Assim, em relação ao ensaio de viabilidade celular, o primeiro teste do MTT demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os materiais CB pura (grupo B), CB/FB 50% (Grupo C) e meio, apesar de ter sido encontrada uma diferença numérica, em média, entre os grupos: $\mu_B=91,25\%$ e $\mu_C=123,81\%$, respectivamente.

Portanto, em termos de viabilidade celular para 48 horas por meio de MTT, nas condições experimentais aplicadas neste estudo, os resultados não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre a celulose bacteriana pura e o compósito produzido, sendo necessários ensaios complementares.

Por outro lado, nos ensaios de citotoxicidade empregando o azul de tripano, foi encontrada uma diferença estatística significativa ($p=0,02$, para $p<0,05$). E ao se aplicar o pós teste de Dunns, este denunciou que a diferença está presente entre o grupo meio e CB/FB 50%. Este ensaio, como relatado anteriormente, demonstra-se efetivo na detecção do dano às membranas das células.

Ainda em relação à adesão e viabilidade celular, as imagens reveladas pelo MEV demonstraram um número muito maior de células aderidas na superfície dos *scaffolds*, indicando que este teve uma performance superior à dos *scaffolds* de CB pura. Estes dados estão coerentes com os achados por meio do ensaio do azul de tripano que indicaram uma diferença estatisticamente significativa para CB/FB 50% ($p=0,02$). Embora os resultados obtidos por meio da aplicação do teste de azul de tripano difiram dos obtidos pelo teste do MTT, ambos ensaios *in vitro* evidenciam alta viabilidade celular para todos os tratamentos. Essa diferença pode ocorrer porque o teste de azul de tripano mede a citotoxicidade por meio da integridade da membrana celular, ao passo que o MTT mede a viabilidade por meio da atividade das desidrogenases da mitocôndria.

Contudo, para que o material seja considerado não citotóxico e biocompatível, os valores para viabilidade celular devem ser superiores a 70%, de acordo com o estabelecido pela norma ISO 10993-5:2009⁴⁵. Então, em relação à citotoxicidade, todos os ensaios aplicados foram coerentes entre si, pois os valores obtidos encontram-se acima dos 70% de viabilidade celular.

Este fato era esperado, já que ambos os materiais isoladamente são biocompatíveis como demonstrado pela literatura consultada. Apesar de existir na literatura apenas um estudo relativo a este nanocompósito baseado em Celulose

bacteriana e fibroína (Lee et al., 2013), este é apresentado em um formato e proporções diferentes das desenvolvidas nesta pesquisa. Deste modo, os pesquisadores⁶⁰ o aplicaram diretamente em defeitos provocados cirurgicamente em ossos zigomáticos de ratos na tentativa de promover regeneração óssea, sem haver nenhum estudo prévio de citotoxicidade in vitro.

O mais indicado é proceder aplicando os testes de citotoxicidade e biocompatibilidade in vitro previamente ao estudo in vivo, pois ao se gerar um novo material compósito, a estrutura pode sofrer modificações o que pode implicar em reações teciduais que não estavam previstas. Além disso, todos os artigos levantados, inclusive os mais atuais, relacionados a materiais compósitos que foram sugeridos para aplicações em bioengenharia e regeneração tecidual foram submetidos à bateria de testes in vitro precedendo os testes in vivo no modelo animal (Gu et al.³⁷, 2013; Lee et al.⁶⁰, 2013; Kim et al.⁵⁴, 2013; Kundu et al.⁵⁷⁻⁵⁸, 2013).

E por fim, as imagens reveladas pelo MEV, que demonstram um maior número de células L929 aderidas ao material desenvolvido do que na celulose pura, estão coerentes com os resultados de adesão após 48h, onde encontrou-se um $p=0,04$, indicando uma maior adesão para o scaffold CB/FB 50%.

Portanto, as etapas iniciais de desenvolvimento de um novo nanocomposto de CB/Fibroína para reparação tecidual e futuras aplicações em odontologia foram conduzidas objetivando a validação da estrutura básica (matriz) necessária à adesão, crescimento e proliferação celular, por meio dos ensaios aplicados neste estudo. As limitações observadas foram quanto ao método escolhido para avaliar a citotoxicidade e as células aplicadas para tanto. Apesar dos parâmetros indicados nas normas ISO⁴⁵ terem sido obedecidos, empregou-se apenas um tipo de célula (células L929) nos testes.

Estudos complementares como testes de citotoxicidade por outro método (como o XTT, por exemplo) e empregando diferentes células, de acordo com o tecido a ser aplicado, bem como averiguar o potencial genotóxico, osteogênico e osteoindutor, a diferenciação celular e liberação controlada de princípios ativos deverão ser realizados. E, adicionalmente, faz-se necessário conduzir testes in vivo em animais para avaliar a performance do material em relação aos tecidos gengivais, mucoso, pulpar e ósseo, específicos da área odontológica.

Até o presente momento e diante das condições experimentais deste estudo, o novo nanocomposto na concentração de CB/FB 50% apresenta grande potencial na regeneração de tecidos e engenharia tecidual, atuando como suporte para a adesão, crescimento e proliferação celular.



Conclusão

6 CONCLUSÃO

Compósitos esponjosos porosos à base de celulose bacteriana e fibroína da seda foram desenvolvidos. As imagens de MEV mostram que os compósitos exibem uma estrutura porosa influenciada pela presença de fibroína e que está interligada à rede de fibras da celulose bacteriana. O tamanho dos poros pode ser controlado pela concentração de fibroína. O melhor resultado obtido foi a do compósito CB/FB50%. Os ensaios de citotoxicidade semeando células L-929 nos scaffolds de CB e CB/FB50% revelaram que o material é biocompatível, permitiu a adesão e proliferação celular, demonstrando que a presença de fibroína favoreceu um aumento significativo na adesão celular no compósito quando comparado com a membrana de CB pura. Faz-se necessário aplicar testes futuros para complementar a avaliação do material. Com base nos dados atuais, no entanto, é possível sugerir que o compósito CB/FB configura uma excelente alternativa para a utilização como *scaffold* para reparação tecidual em odontologia.



Referências

7 REFERÊNCIAS*

1. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*. 2003; 24(3): 401-16.
2. Alvarez OM, Patel M, Booker J, Markowitz L. Effectiveness of a biocellulose wound dressing for the treatment of chronic venous leg ulcers: results of a single center randomized study involving 24 patients. *Wounds*. 2004; 16(7): 224–33.
3. Armentano I, Dottori M, Fortunati E, Mattioli S, Kenny J. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. *Polym Degrad Stab*. 2010; 95(11): 2126-46.
4. Badami AS, Kreke MR, Thompson MS, Riffle JS, Goldstein AS. Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates. *Biomaterials*. 2006;27(4):596-606.
5. Backdahl H, Helenius G, Bodin A, Nannmark U, Johansson BR, Risberg B, et al. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials*. 2006; 27(9): 2141-9.
6. Barud H, Ribeiro C, Crespi M, Martines M, Dexpert-Ghys J, Marques R, et al. Thermal characterization of bacterial cellulose-phosphate composite membranes. *J Therm Anal Calorim*. 2007; 87(3): 815-8.
7. Barud H, de Araujo A, Santos D, de Assuncao R, Meireles C, Cerqueira D, et al. Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose. *Thermochim. Acta*. 2008; 471(1-2): 61-9.
8. Barud H. Materiais multifuncionais baseados em celulose bacteriana [tese de doutorado]. Araraquara: Instituto de Química da Unesp; 2010.
9. Barud H, Souza J, Santos D, Crespi M, Ribeiro C, Messaddeq Y et al. Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes. *Carbohydr Polym*. 2011; 83(3): 1279-84.
10. Barud H, Caiut J, Dexpert-Ghys J, Messaddeq Y, Ribeiro S. Transparent bacterial cellulose-boehmite-epoxi-siloxane nanocomposites. *Composites Part A*. 2012; 43(6): 973-7.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

11. Bhardwaj N, Nguyen QT, Chen AC, Kaplan DL, Sah RL, Kundu SC. Potential of 3-D tissue constructs engineered from bovine chondrocytes/silk fibroin-chitosan for in vitro cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2011; 32(25): 5773-81.
12. Biondi M, Ungaro F, Quaglia F, Netti P. Controlled drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; 60(2): 229-42.
13. Bodin A, Bharadwaj S, Wu S, Gatenholm P, Atala A, Zhang Y. Tissue-engineered conduit using urine-derived stem cells seeded bacterial cellulose polymer in urinary reconstruction and diversion. *Biomaterials*. 2010; 31(34): 8889-901.
14. Bray LJ, George KA, Ainscough SL, Hutmacher DW, Chirila TV, Harkin DG. Human corneal epithelial equivalents constructed on Bombyx mori silk fibroin membranes. *Biomaterials*. 2011; 32(22): 5086-91.
15. Brown AJ. An acetic ferment which forms cellulose. *J Chem Soc*. 1886; 49: 432–9.
16. Cai XJ, Xu YY. Nanomaterials in controlled drug release. *Cytotechnology*. 2011; 63(4): 319-23.
17. Cai Z, Kim J. Bacterial cellulose/poly(ethylene glycol) composite: characterization and first evaluation of biocompatibility. *Cellulose*. 2010; 17(1): 83-91.
18. Cattaneo I, Figliuzzi M, Azzollini N, Catto V, Fare S, Tanzi M, Alessandrino A, et al. In vivo regeneration of elastic lamina on fibroin biodegradable vascular scaffold. *Int J Artif Organs*. 2013; 36(3): 166-74.
19. Causin F, Pascarella R, Pavesi G, Marasco R, Zambon G, Battaglia R, et al. Acute endovascular treatment (< 48 hours) of uncoilable ruptured aneurysms at non-branching sites using silk flow-diverting devices. *Interv Neuroradiol*. 2011; 17(3): 357-64.
20. Chen F, Zhang M, Wu Z. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials*. 2010; 31(24): 6279-308.
21. Chiaoprakobkij N, Sanchavanakit N, Subbalekha K, Pavasant P, Phisalaphong M. Characterization and biocompatibility of bacterial cellulose/alginate composite sponges with human keratinocytes and gingival fibroblasts. *Carbohydr Polym*. 2011; 85(3): 548-553.

22. Chiu L, Weisel R, Li R, Radisic M. Defining conditions for covalent immobilization of angiogenic growth factors onto scaffolds for tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011; 5(1): 69-84.
23. Cunha C, Panseri S, Antonini S. Emerging nanotechnology approaches in tissue engineering for peripheral nerve regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011; 7(1): 50-9.
24. Czaja WK, Young DJ, Kawecki M, Brown RM. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules.* 2007; 8(1): 1-12.
25. De Salvi D, Barud H, Caiut J, Messaddeq Y, Ribeiro S. Self-supported bacterial cellulose/boehmite organic-inorganic hybrid films. *J Solgel Sci Technol.* 2012; 63(2): 211-8.
26. De Souza FC, Olival-Costa H, Da Silva L, Pontes PA, Lancellotti CLP. Bacterial cellulose as laryngeal medialization material: an experimental study. *J Voice.* 2011; 25(6): 765-9.
27. Dulbecco P, Savarino V. Therapeutic potential of curcumin in digestive diseases. *World J Gastroenterol.* 2013; 19(48): 9256-70.
28. Enomoto S, Sumi M, Kajimoto K, Nakazawa Y, Takahashi R, Takabayashi C et al. Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material. *J Vasc Surg.* 2010; 51(1): 155-64.
29. Falcão SC, Coelho AR, Evêncio Neto J. Biomechanical evaluation of microbial cellulose (*Zoogloea* sp.) and expanded polytetrafluoroethylene membranes as implants in repair of produced abdominal wall defects in rats. *Acta Cir Bras.* 2008; 23(2): 184-91.
30. Falcão SC, Evêncio Neto J, Coelho AR. Incorporation by host tissue of two biomaterials used as repair of defects produced in abdominal wall of rats. *Acta Cir Bras.* 2008; 23(1): 78-83.
31. Fang Q, Chen D, Yang Z, Li M. In vitro and in vivo research on using *Antheraea pernyi* silk fibroin as tissue engineering tendon scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2009; 29(5): 1527-34.

32. Fontana J, De Souza A, Fontana C, Torriani I, Moreschi J, Gallotti B, De Souza S, et al. *Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. Appl Biochem Biotechnol.* 1990; 24-25(1): 253-64.
33. Fu L, Zhang Y, Li C, Wu Z, Zhuo Q, Huang X, Qiu G, et al. *Skin tissue repair materials from bacterial cellulose by a multilayer fermentation method. J Mater Chem.* 2012; 22(24): 12349-57.
34. Ge Z, Yang Q, Xiang X, Liu KZ. *Assessment of silk fibroin for the repair of buccal mucosa in a rat model. Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012; 41(5): 673-80.
35. George KA, Shadforth AMA, Chirila TV, Laurent MJ, Stephenson SA, Edwards GA, et al. *Effect of the sterilization method on the properties of Bombyx mori silk fibroin films. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013; 33(2): 668-74.
36. Grande C, Torres F, Gomez C, Bano M. *Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. Acta Biomater.* 2009; 5(5): 1605-15.
37. Gu Y, Zhu J, Xue C, Li Z, Ding F, Yang Y, Gu X. *Chitosan/silk fibroin-based, Schwann cell-derived extracellular matrix-modified scaffolds for bridging rat sciatic nerve gaps. Biomaterials.* 2014;35(7):2253-63.
38. Helenius G, Bäckdahl H, Bodin A, Nannmark U, Gatenholm P, Risberg B. *In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. J Biomed Mater Res A.* 2006; 76(2): 431-8.
39. Hofmann S, Stok KS, Kohler T, Meinel AJ, Müller R. *Effect of sterilization on structural and material properties of 3-D silk fibroin scaffolds. Acta Biomater.* 2014; 10(1): 308-17.
40. Hu K, Lv Q, Cui FZ, Feng QL, Kong XD, Wang HL, et al. *Biocompatible fibroin blended films with recombinant human-like collagen for hepatic tissue engineering. J Bioact Compat Polym.* 2006; 21(1): 23-37.
41. Hu W, Chen S, Yang J, Li Z, Wang H. *Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. Carbohydr Polym.* 2014; 101(2014):1043-60.

42. Hu Y, Catchmark JM. Integration of cellulases into bacterial cellulose: toward bioabsorbable cellulose composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011; 97(B1): 114-23.
43. Hu Y, Catchmark JM. In vitro biodegradability and mechanical properties of bioabsorbable bacterial cellulose incorporating cellulases. *Acta Biomater.* 2011; 7(7): 2835-45.
44. Huang W, Begum R, Barber T, Ibba V, Tee NCH, Hussain M, et al. Regenerative potential of silk conduits in repair of peripheral nerve injury in adult rats. *Biomaterials.* 2012; 33(1): 59-71.
45. International standard organization. ISO: 10993-5. Biological evaluation of medical devices- Part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Bruxelles: ISO; 2009. [1 jun 2009].
46. Jones GL, Motta A, Marshall MJ, El Haj AJ, Cartmell SH. Osteoblast: osteoclast co-cultures on silk fibroin, chitosan and PLLA films. *Biomaterials.* 2009; 30(29): 5376-84.
47. Kasoju N, Bora U. Fabrication and characterization of curcumin-releasing silk fibroin scaffold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012; 100(7): 1854-66.
48. Kasoju N, Bora U. Silk fibroin based biomimetic artificial extracellular matrix for hepatic tissue engineering applications. *Biomed Mater.* 2012; 8(4): 049501.
49. Kasoju N, Bora U. Silk fibroin in tissue engineering. *Adv Healthc Mater.* 2012; 1(4): 393-412.
50. Kim U, Park J, Kim H, Wada M, Kaplan D. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials.* 2005; 26(15): 2775-85.
51. Kim H, Yoon SC, Lee TY, Jeong D. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicol Lett.* 2009; 184(1): 13-7.
52. Kim J, Kim C, Park C, Seo J, Kweon H, Kang S, Lee K. Comparison of methods for the repair of acute tympanic membrane perforations: silk patch vs. paper patch. *Wound Repair Regen.* 2010; 18(1): 132-8.

53. Kim J, Cai Z, Lee H, Choi G, Lee D, Jo C. Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/Chitosan composite for potential biomedical application. *J Polym Res*. 2011; 18(4): 739-44.
54. Kim J, Kim S, Park S, Lim K, Seonwoo H, Kim Y, et al. Bacterial cellulose nanofibrillar patch as a wound healing platform of tympanic membrane perforation. *Adv Healthc Mater*. 2013; 2(11): 1525-31.
55. Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2005; 44(22): 3358-93.
56. Kong X, Cui F, Wang X, Zhang M, Zhang W. Silk fibroin regulated mineralization of hydroxyapatite nanocrystals. *J Cryst Growth*. 2004; 270(1-2): 197-202.
57. Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, Wang X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013; 65(4): 457-70.
58. Kundu B, Saha P, Datta K, Kundu SC. A silk fibroin based hepatocarcinoma model and the assessment of the drug response in hyaluronan-binding protein 1 overexpressed HepG2 cells. *Biomaterials*. 2013; 34(37): 9462-74.
59. Kweon H, Lee KG, Chae CH, Balázs C, Min SK, Kim JY, et al. Development of nano-hydroxyapatite graft with silk fibroin scaffold as a new bone substitute. *J Oral Maxillofac Res*. 2011; 69(6): 1578-86.
60. Lee J, Kim J, Lee O, Park C. The fixation effect of a silk fibroin-bacterial cellulose composite plate in segmental defects of the zygomatic arch an experimental study. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013; 139(6): 629-35.
61. Leonardi M, Cirillo L, Toni F, Dall'olio M, Princiotta C, Stafa A, et al. Treatment of intracranial aneurysms using flow-diverting silk stents (BALT): a single centre experience. *Interv Neuroradiol*. 2011; 17(3): 306-15.
62. Levin B, Redmond SL, Rajkhowa R, Eikelboom RH, Marano RJ, Atlas MD. Preliminary results of the application of a silk fibroin scaffold to otology. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010; 142 (3 Suppl 1):S33-5.

63. Li G, Liu H, Zhao H, Gao Y, Wang J, Jiang H, et al. Chemical assembly of TiO₂ and TiO₂Ag nanoparticles on silk fiber to produce multifunctional fabrics. *J Colloid Interface Sci.* 2011; 358(1): 307-15.
64. Lin W, Lien C, Yeh H, Yu C and Hsu S. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. *Carbohydr Polym.* 2013; 94(1): 603-11.
65. Lu Q, Wang X, Lu S, Li M, Kaplan DL, Zhu H. Nanofibrous architecture of silk fibroin scaffolds prepared with a mild self-assembly process. *Biomaterials.* 2011; 32(4): 1059-67.
66. Ma P. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(2): 184-98.
67. Madden PW, Lai JNX, George KA, Giovenco T, Harkin DG, Chirila TV. Human corneal endothelial cell growth on a silk fibroin membrane. *Biomaterials.* 2011; 32(17): 4076-84.
68. Marelli B, Alessandrino A, Fare S, Freddi G, Mantovani D and Tanzi M. Compliant electrospun silk fibroin tubes for small vessel bypass grafting, *Acta Biomater.* 2010; 6(10): 4019-26.
69. Meinel L, Betz O, Fajardo R, Hofmann S, Nazarian A, Cory E, et al. Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. *Bone.* 2006; 39(4): 922-31.
70. Nazarov R, Jin H, Kaplan D. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. *Biomacromolecules.* 2004; 5(3): 718-26.
71. Nogueira G, Weska R, Vieira W, Polakiewicz B, Rodas A, Higa O, et al. A new method to prepare porous silk fibroin membranes suitable for tissue scaffolding applications. *J Appl Polym Sci.* 2009; 114(1): 617-23.
72. Omenetto F, Kaplan D. New opportunities for an ancient material. *Science.* 2010; 329(5991): 528-31.
73. Patra C, Talukdar S, Novoyatleva T, Velagala SR, Mühlfeld C, Kundu B, et al. Silk protein fibroin from *Antheraea mylitta* for cardiac tissue engineering. *Biomaterials.* 2012; 33(9): 2673-80.

74. Pertile RAN, Andrade FK, Alves Jr C, Gama M. Surface modification of bacterial cellulose by nitrogen-containing plasma for improved interaction with cells, *Carbohydr Polym.* 2010; 82(3): 692-8.
75. Pertile RAN, Moreira S, Andrade FK, Domingues L, Gama M. Bacterial cellulose modified using recombinant proteins to improve neuronal and mesenchymal cell adhesion. *Biotechnol Prog.* 2012; 28(2):526-32.
76. Portal O, Clark WA, Levinson DJ. Microbial cellulose wound dressing in the treatment of nonhealing lower extremity ulcers. *Wounds.* 2009; 21(1): 1-3.
77. Rockwood D, Preda R, Yucel T, Wang X, Lovett M, Kaplan D. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nat Protoc.* 2011; 6(10): 1612-31.
78. Sabbag OJ, Nicodemo D, Oliveira JEM. Custos e viabilidade econômica da produção de casulos do bicho-da-seda. *Pesq Agropec Trop.* 2013; 43(2): 187-94. Disponível online: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/pat/article/view/20702>
79. Sahoo S, Lok Toh S, Hong Goh JC. PLGA nanofiber-coated silk microfibrous scaffold for connective tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010; 95(1): 19-28.
80. Santos V. Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. In: Duarte Y, editor. *Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico.* São Paulo: Atheneu; 2000. p. 265-306.
81. Saska S, Barud HS, Gaspar AM, Marchetto R, Ribeiro SJ, Messaddeq Y. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. *Int J Biomater.* 2011; 2011:175362. doi: 10.1155/2011/175362. Epub 2011 Sep 27
82. Saska S, Scarel-Caminaga R, Teixeira L, Franchi L, dos Santos R, Gaspar A, Oliveira P, et al. Characterization and in vitro evaluation of bacterial cellulose membranes functionalized with osteogenic growth peptide for bone tissue engineering. *J Mater Sci-Mater M.* 2012; 23(9): 2253-66.
83. Seok H, Lee SW, Kim SG, Seo DH, Kim HS, Kweon H Y, et al. The effect of silk membrane plus 3% 4-hexylresorcinol on guided bone regeneration in a rabbit calvarial defect model. *Int J Indust Entomol.* 2013; 27(1): 209-17.

84. Shah N, Ul-Islam M, Khattak W, Park J. Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. *Carbohydr Polym.* 2013; 98(2): 1585-98.
85. Shang S, Zhu L, Fan J. Intermolecular interactions between natural polysaccharides and silk fibroin protein. *Carbohydr Polym.* 2013; 93(2): 561-73.
86. Shevchenko RV, James SL, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface.* 2010; 7(43): 229-58.
87. Shi J, Votruba A, Farokhzad O, Langer R. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Lett.* 2010; 10(9): 3223-30.
88. Shi LB, Cai HX, Chen LK, Wu Y, Zhu SA, Gong XN, et al. Tissue engineered bulking agent with adipose-derived stem cells and silk fibroin microspheres for the treatment of intrinsic urethral sphincter deficiency. *Biomaterials.* 2014; 35(5): 1519-30.
89. Stoica-Guzun A, Stroescu M, Jipa I, Dobre L, Zaharescu T. Effect of γ irradiation on poly(vinyl alcohol) and bacterial cellulose composites used as packaging materials. *Radiat Phys Chem.* 2013; 84(2013): 200-4. doi:10.1016/j.radphyschem.2012.06.017.
90. Sugiyama J, Persson J, Chanzy H. Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native celluloses. *Macromolecules.* 1991; 24:2461-6.
91. Talukdar S, Nguyen QT, Chen AC, Sah RL, Kundu SC. Effect of initial cell seeding density on 3D-engineered silk fibroin scaffolds for articular cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2011; 32(34): 8927-37.
92. Unger RE, Wolf M, Peters K, Motta A, Migliaresi C, James Kirkpatrick C. Growth of human cells on a non-woven silk fibroin net: a potential for use in tissue engineering. *Biomaterials.* 2004; 25(6): 1069-75.
93. Unger RE, Ghanaati S, Orth C, Sartoris A, Barbeck M, Halstenberg S, et al. The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. *Biomaterials.* 2010; 31(27): 6959-67.
94. Wang CY, Zhang KH, Fan CY, Mo XM, Ruan HJ, Li FF. Aligned natural–synthetic polyblend nanofibers for peripheral nerve regeneration. *Acta Biomater.* 2011; 7(2): 634-43.

95. Wei B, Yang G, Hong F. Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties. *Carbohydr Polym.* 2011; 84(1): 533-8.
96. Wei Y. Chitosan/silk fibroin-based tissue-engineered graft seeded with adipose-derived stem cells enhances nerve regeneration in a rat model. *J Mater Sci-Mater M.* 2011; 22(8): 1947-64.
97. Wieman T. Introduction to care of chronic wounds. *Am J Surg.* 1998; 176(2A): 1S-2S.
98. Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials.* 2009; 30(30): 5897–909. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.027.
99. Wippermann J, Schumann D, Klemm D, Kosmehl H, Satehi-Gelani S, Wahlers T. Preliminary results of small arterial substitute performed with a new cylindrical biomaterial composed of bacterial cellulose. *Eur J Vasc Endovasc.* 2009; 37(5): 592-96.
100. Wu SQ, Li MY, Fang BS, Tong H. Reinforcement of vulnerable historic silk fabrics with bacterial cellulose film and its light aging behavior. *Carbohydr Polym.* 2012; 88(2): 496-501.
101. Yang T, Zhang MC. Biocompatibility of silk fibroin membrane as tissue engineering corneal scaffold. *Int J Ophthalmol.* 2008; 8(8):1557-9.
102. Yang MC, Wang S-S, Chou NK, Chi NH, Huang YY, Chang YL, et al. The cardiomyogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells on silk fibroin–polysaccharide cardiac patches in vitro. *Biomaterials.* 2009; 30(22): 3757-65.
103. Yeo IS, Oh JE, Jeong L, Lee TS, Lee SJ, Park WH, et al. Collagen-based biomimetic nanofibrous scaffolds: Preparation and characterization of collagen/silk fibroin bicomponent nanofibrous structures. *Biomacromolecules.* 2008; 9(4): 1106-16.
104. Yoo CR, Yeo IS, Park KE, Park JH, Lee SJ, Park WH, et al. Effect of chitin/silk fibroin nanofibrous bicomponent structures on interaction with human epidermal keratinocytes. *Int J Biol Macromol.* 2008; 42(4): 324-34.
105. Zang S, Zhuo Q, Chang X, Qiu G, Wu Z, Yang G. Study of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells (HASCs) on bacterial cellulose. *Carbohydr Polym.* 2014; 104(15): 158–65.

106. Zhou CZ, Confalonieri F, Medina N, Zivanovic Y, Esnault C, Yang T, et al. Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. Nucleic Acids Res. 2000; 28(12): 2413-9.

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 17 de Março de 2014

Hélida Gomes de Oliveira Barud