

# PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS DE CELULOSE BACTERIANA E QUERATINA PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDOS

**André Santos da Costa**<sup>1</sup>; Katharine Valeria Saraiva Hodel<sup>2</sup>; Bruna Aparecida Souza Machado<sup>3</sup>; Josiane Dantas Viana Barbosa<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Graduando em Engenharia de Materiais; Iniciação Científica – FAPESB; andre.costas@hotmail.com

<sup>2</sup> Mestranda em Farmácia; Universidade Federal da Bahia; Salvador-BA; k2hodel@gmail.com

<sup>3</sup> Doutora em Biotecnologia; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; brunam@fieb.org.br

<sup>4</sup> Doutora em Ciências e Engenharia de Materiais; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; josianedantas@fieb.org.br

## RESUMO

Diante de uma demanda global pela melhora na qualidade de vida, diversos incidentes ou acidentes ainda geram mortes e traumas irreversíveis para o corpo humano, principalmente quando se trata de queimaduras, doenças de pele crônicas e até úlceras. Neste sentido, o desenvolvimento de novos biomateriais associado a outros biopolímeros para curativos vem ganhando visibilidade. Dentre eles, podemos citar a celulose bacteriana (CB) que é um biopolímero, biocompatível, com ótimas propriedades mecânicas, elevada pureza, alto grau de cristalinidade e possibilidade de produção de compósitos, entretanto apresentam pontos a melhorar que podem ser resolvidos com a adição de outros materiais, tal como a queratina, uma proteína estrutural que apresenta boas propriedades. Com isso esse estudo tem o objetivo de produzir biocompósitos de CB (produzida pela *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769), a partir de diferentes fontes de carbono, com adição de queratina e a caracterização para estudo do potencial uso de curativos para queimaduras de pele. Como resultados parciais obtidos até momento, foi observado que a CB apresenta uma maior produção quando a fonte de cultivo é a glicose. Estudos futuros de suas propriedades serão realizados para analisar a influência da adição de queratina nas suas propriedades.

**PALAVRAS-CHAVE:** Celulose bacteriana; Queratina; Biomateriais; Engenharia de tecido.

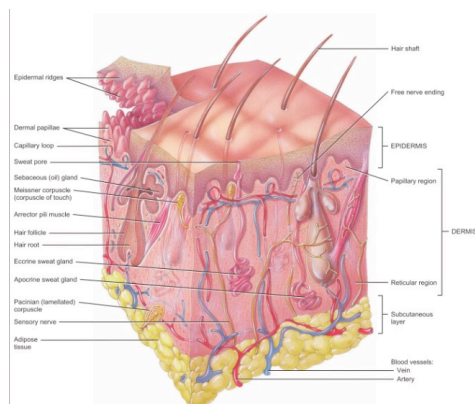
## 1. INTRODUÇÃO

Para a maioria dos vertebrados, a pele é a camada mais externa do corpo e atua como uma primeira proteção barreira contra agentes externos, como calor, luz, infecção e lesões. É também uma importante interface com o nosso ambiente, hospedando uma infinidade de sensores, glândulas, canais e poros que permite que os organismos sintam toque, calor, dor, regulem sua temperatura corporal e higrometria.<sup>1</sup>

Sua estrutura pode ser decomposta em três regiões principais e é descrita pelo esquema na Figura 1. A epiderme (50 µm-150 µm de espessura para humanos)<sup>2,3,4</sup> é a parte externa camada da pele e cumpre principalmente a função de uma interface de barreira e troca com o exterior<sup>5</sup>. Renovação e crescimento constantes ocorrem em suas subcamadas, onde as células-tronco no interior. O estrato basal se diferencia em queratinócitos, que depois migram para o exterior e eventualmente decaem como corneócitos, formando o estrato córneo, uma camada queratinizada resistente.<sup>1,6</sup> A derme (150 µm a 4 mm de espessura para humanos)<sup>7,8</sup> apoia a epiderme, fornecendo-lhe nutrientes e suporte estrutural através da derme papilar, onde cristas onduladas facilitam trocas. A derme reticular compreende uma variedade de sensores, glândulas e vasos, e é responsável por grande parte das propriedades mecânicas da pele em tensão por meio de uma camada e denso arranjo de fibras onduladas de colágeno (~ 60-80% do peso do tecido seco), elastina e fibras transversais (~ 1-4% do peso do tecido seco), todas incorporadas em uma matriz proteoglicana comumente referida como substância fundamental.<sup>7,8,9</sup> A hipoderme (ou camada subcutânea) é a camada mais interna da pele e é composto principalmente de tecido adiposo, no qual os adipócitos formam aglomerados chamados glóbulos, cercados por uma rede fibrocolagênica. Suas principais funções são fornecer fontes térmicas, isolamento, armazenar energia e absorver choques.<sup>7,8</sup> Sua estrutura frouxa de tecido conjuntivo também permite minimizar o atrito com o tecido muscular vizinho. Sua espessura varia muito dependendo da região do corpo e do sujeito.

Diante do exposto a acima a pele é um dos maiores órgãos dos seres humanos, e hoje problemas associados a pele como queimaduras ainda se faz necessário uma série de cuidados e de protocolos terapêuticos. A queimadura é todo ferimento provocado por agentes externos sobre o revestimento do corpo desde a pele até ossos e órgãos,<sup>10</sup> as queimaduras são responsáveis por 180.000 mortes por ano e esta entre as principais causas do índice de esperança de vida corrigida por incapacidade (EVCI) em países de baixa e média renda, além de que queimaduras não fatais são principais causas de morbidade, desfiguração, incapacidade e geralmente resultam em estigma e rejeição pela população.<sup>11</sup> Com isso, o desenvolvimento da área de engenharia de tecidos e de novos curativos se torna necessário.

**Figura 1** - Seção transversal da pele de mamíferos, mostrando a diversidade de elementos funcionais e estruturas presentes nas diferentes camadas. Fonte: Tortora, & Colaboradores, 2009.



Celulose bacteriana (CB) apresenta a mesma fórmula química da celulose vegetal ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> com partes de β-D-glucose conectadas por ligações intermoleculares de hidrogênio,<sup>12</sup> fazendo com que apresente alto grau de pureza (sem lignina e hemicelulose) e uma estrutura microfibrilar que são responsáveis pelas suas propriedades, como a alta resistência a tração, alto índice de cristalinidade, e maior grau de polimerização, que por consequência, produzem uma CB com boas propriedades físicas, mecânicas e térmicas,<sup>13</sup> aliado a isso, tem o fato de poderem ser fabricados compósitos, como a adição de argila montmorilonita<sup>12</sup> e de blendas poliméricas<sup>14</sup> tal como a queratina.<sup>15</sup>

Diversos materiais são utilizados para produção de compósitos com a CB<sup>14</sup>, entre eles a queratina, que é uma proteína estrutural mais abundantes em células epiteliais<sup>16</sup> e dentre os materiais biológicos se posiciona como o mais resistente, possuindo alta resistência e alto módulo.<sup>17</sup> A queratina tem a capacidade de regular a inserção nas células, e também a adesão e migração promovendo estrutura e formando barreiras para as células epiteliais.<sup>15</sup> Com isso, essa proteína estrutural tem sido muito pesquisada para utilização em *scaffolds*, distribuição de medicamentos e em tratamento para queimaduras dérmicas.<sup>16</sup>

Unindo os pontos positivos e a aplicabilidade semelhante da queratina e da CB,<sup>18</sup> esse estudo tem como objetivo a produção e caracterização de membranas de CB, produzidas pela *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC 23769) sob condições estáticas usando diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, manitol e xilose), e adicionando a queratina para potencial curativo de ferimentos e queimaduras na pele.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA

A celulose bacteriana é produzida a partir da bactéria *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC 23769) pelo método de fermentação estática. Para a produção em situ da celulose com queratina foi utilizado o meio de cultura Hestrin-*Scharamm* (HS) modificado, contendo 50 g.L<sup>-1</sup> de fonte de carbono (glicose, sacarose, manitol e xilose), 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 3 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 2 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 3 g.L<sup>-1</sup> de Queratina. Todos os meios de cultura foram esterilizados (121 °C, 1 ATM e 15 min) e armazenados em estufa bacteriológica a 30 °C por 14 dias.

### 2.2 PURIFICAÇÃO

As membranas de CB são lavadas primeiramente com água destiladas a 90 °C por 1h para remover impurezas do meio de cultura, após isso são tratadas em meio alcalino de carbonato de potássio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 0,3 mol.L<sup>-1</sup> a 90 °C por 1h e lavadas com água destilada até obtenção de pH neutro. As membranas purificadas são secas a 50°C por 24h e armazenadas para testes futuros.

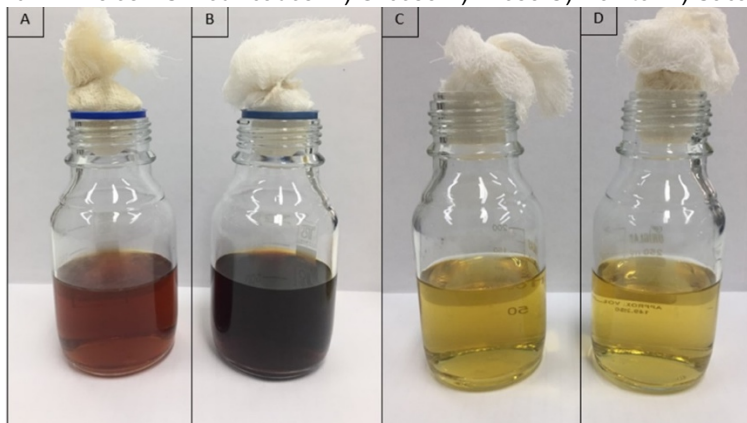
**Tabela 1** - Componentes e concentrações do meio de cultura

Componentes	Meio de Cultura (g.L <sup>-1</sup> )			
	Glicose	Sacarose	Manitol	Xilose
Glicose	50	-	-	-
Sacarose	-	50	-	-
Manitol	-	-	50	-
Xilose	-	-	-	50
Extrato de Levedura	5	5	5	5
Peptona	3	3	3	3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	2	2	2
Queratina	3	3	3	3

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA

A partir da produção dos meios seguindo a proporção da Tabela 1, os meios foram armazenados na estufa como segue a Figura 2, para posterior filtração da membrana. Após isso, foi realizado uma avaliação visual em que é possível concluir que a glicose é o meio mais eficiente para produção da CB, ou seja, melhor meio de cultura para o desenvolvimento da membrana.

Figura 2 – Meios HS modificados. A) Glicose B) Xilose C) Manitol D) Sacarose.



### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir desses dados, pretende-se realizar testes futuros para a caracterização do material obtido. De uma maneira geral, o estudo mostrou-se com resultados promissores o que irá permitir testes “*in vitro*” e posteriormente “*in vivo*”.

### Agradecimentos

Agradeço ao SENAI CIMATEC pela estrutura laboratorial, a FAPESB pela concessão da bolsa, a toda equipe do laboratório pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa e a minha orientadora por me proporcionar essa experiência e todo apoio que tem me dado.

### 5. REFERÊNCIAS

- <sup>2</sup> J.T. Whitton, J.D. Everall, **The thickness of the epidermis**, Br. J. Dermatol. 89 (1973) 467–476. doi:10.1111/j.1365-2133.1973.tb03007.x.
- <sup>3</sup> M. Huzaira, F. Rius, M. Rajadhyaksha, R.R. Anderson, S. González, **Topographic variations in normal skin, as viewed by in vivo reflectance confocal microscopy**, J. Invest. Dermatol. 116 (2001) 846–852. doi:10.1046/j.0022-202X.2001.01337.x.
- <sup>4</sup> J. Sandby-Møller, T. Poulsen, H.C. Wulf, **Epidermal Thickness at Different Body Sites: Relationship to Age, Gender, Pigmentation, Blood Content, Skin Type and Smoking Habits**, Acta Derm. Venereol. 83 (2003) 410–413. doi:10.1080/00015550310015419.
- <sup>5</sup> F.M. Hendriks, D. Brokken, C.W.J. Oomens, D.L. Bader, F.P.T. Baaijens, **The relative contributions of different skin layers to the mechanical behavior of human skin in vivo using suction experiments**, 28 (2006) 259–266. doi:10.1016/j.medengphy.2005.07.001.
- <sup>6</sup> M.F. Leyva-Mendivil, A. Page, N.W. Bressloff, G. Limbert, **A mechanistic insight into the mechanical role of the stratum corneum during stretching and compression of the skin**, J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 49 (2015) 197–219. doi:10.1016/j.jmbbm.2015.05.010.
- <sup>7</sup> J.W.Y. Jor, M.D. Parker, A.J. Taberner, M.P. Nash, P.M.F. Nielsen, **Computational and experimental characterization of skin mechanics: Identifying current challenges and future directions**, Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. 5 (2013) 539–556. doi:10.1002/wsbm.1228.
- <sup>8</sup> G.L. Wilkes, I.A. Brown, R.H. Wildnauer, **The biomechanical properties of skin**, CRC Crit. Rev. Bioeng. 1 (1973) 453–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4581809>.
- <sup>9</sup> G. Limbert, **Mathematical and computational modelling of skin biophysics: a review**, Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci. 473 (2017) 20170257. doi:10.1098/rspa.2017.0257.
- <sup>10</sup> NOTÍCIAS de Saúde: Queimaduras. In: ABERT EISTEIN, Hospital Israelita. **Doenças Sintomas: Queimaduras**. São Paulo, 2016. Disponível em: <https://www.einstein.br/doencas-sintomas/queimaduras>. Acesso em: 2 abr. 2020.
- <sup>11</sup> WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. **Fact Sheets: Burns**. [S. l.], 6 mar. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>. Acesso em: 3 abr. 2020.
- <sup>12</sup> Hodel, Katharine Valéria Saraiva et al. **Evaluation of Different Methods for Cultivating Gluconacetobacter hansenii for Bacterial Cellulose and Montmorillonite Biocomposite Production: Wound-Dressing Applications**. Polymers vol. 12,2 267. 26 Jan. 2020, doi:10.3390/polym12020267
- <sup>13</sup> MOHITE, Bhavna V.; PATIL, Satish V. **Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by G. hansenii NCIM 2529**. Carbohydrate polymers, v. 106, p. 132-141, 2014.

- <sup>14</sup> ISLAM, Mazhar UI et al. **Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose.** International journal of biological macromolecules, v. 102, p. 1166-1173, 2017.
- <sup>15</sup> KESKIN, Zalike; URKMEZ, Aylin Sendemir; HAMES, E. Esin. **Novel keratin modified bacterial cellulose nanocomposite production and characterization for skin tissue engineering.** Materials Science and Engineering: C, v. 75, p. 1144-1153, 2017.
- <sup>16</sup> NAVARRO, Javier et al. **Development of keratin-based membranes for potential use in skin repair.** Acta biomaterialia, v. 83, p. 177-188, 2019.
- <sup>17</sup> WANG, Bin et al. **Keratin:** Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. Progress in Materials Science, v. 76, p. 229-318, 2016.
- <sup>18</sup> MOHAMMADKAZEMI, Faranak; AZIN, Mehrdad; ASHORI, Alireza. **Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media.** Carbohydrate polymers, v. 117, p. 518-523, 2015.