

Avaliação de metodologias para a reutilização de membranas de nanocelulose bacteriana como scaffold para cultura celular¹

Evaluation of methods for the recovery of bacterial nanocellulose membranes scaffold for cell culture

Fernanda Brito Leite²

Ana Beatriz C. Santos-Valle³

Camila Quinetti Paes⁴

Frederico Pittella⁵

DOI: <https://doi.org/10.34019/2179-3700.2019.v19.29916>

Resumo

Biofilmes bacterianos constituídos por matrizes biocompatíveis têm sido estudados como *scaffolds* celulares a serem aplicados na engenharia de tecidos. Em especial, membranas de nanocelulose bacteriana têm sido testadas *in vitro* e *in vivo* e descartadas. Mesmo com o reconhecimento da importância do reaproveitamento de materiais, ainda existem poucas metodologias para reutilizar este recurso. Este trabalho teve como objetivo avaliar metodologias de reutilização de membranas de nanocelulose bacteriana (BNC – *bacterial nanocellulose membranes*), previamente usadas em testes biológicos, com a finalidade de serem novamente viáveis como *scaffold* na cultura de células, evitando gastos dispendiosos e tempo de preparação de novas membranas. Para tal, membranas utilizadas em experimentos de projetos de doutorado que fazem o desenvolvimento de pele artificial foram reservadas para a tentativa de recuperação. Foram estabelecidos ensaios de higienização com base em métodos de purificação inicial, ou seja, métodos de retirada da bactéria do biofilme, deixando a membrana limpa e pronta para uso. As metodologias testadas baseiam-se em aplicação de pH extremo para degradação de materiais celulares, seguido de lavagem e esterilização. Para avaliar os resultados, as membranas foram fotografadas através de um microscópio óptico invertido. A espessura das membranas foi aferida por meio de um paquímetro; também foi calculada a perda de água das membranas, sendo esses parâmetros definidos antes e depois dos ensaios de limpeza. Em comparação microscópica feita da membrana sem e com o tratamento, verificou-se que após o tratamento não haviam restos ou resíduos celulares. Não foi observada alteração relevante na espessura da membrana, resultado semelhante ao do potencial de perda de água. Além disso, foi verificada a viabilidade de

¹ Trabalho premiado no Seminário de Iniciação Científica da UFJF em 2018.

² Bolsista do XXVI Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq/UFJF – 2017/2018), do XXX Programa de Bolsas de Iniciação Científica (BIC/UFJF – 2017/2018) e I Voluntariado de Iniciação Científica (VIC/UFJF).

³ Colaboradora no projeto. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

³ Colaboradora no projeto. Departamento de Enfermagem Básica da Faculdade de Enfermagem da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

⁴ Professor orientador. Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), e-mail: frederico.pittella@ufjf.edu.br.



fibroblastos cultivados nas membranas recuperadas. Verificou-se que os métodos testados podem ser úteis na recuperação de membranas de nanocelulose utilizadas para nova aplicação, sendo o aproveitamento de grande relevância considerando custo, tempo, recurso e infraestrutura necessários para produção dos biofilmes como material biotecnológico de aplicação em engenharia de tecidos.

Palavras-chave: Membranas de nanocelulose bacteriana. Reutilização de scaffolds. Engenharia de tecidos. Biofilmes.

Abstract

Bacterial biofilms have been applied as cellular scaffold on studies for tissue engineering. In particular, bacterial nanocellulose sterile membranes have been tested *in vitro* and *in vivo* and discarded after use. Even though there is consensus on the importance of recycling materials, there are still few methodologies to reuse this resource. Thus, the objective of this project is to evaluate methodologies to recover bacterial nanocellulose membranes (BNC) used in biological tests, with the purpose of being viable again as scaffold in cell culture, while avoiding manufacture expenses and long preparation time of new membranes. To this end, membranes used in experiments of doctorate projects involved with the development of artificial skin were reserved for recovery. Recovery and cleaning tests were established based on initial purification methods, in which bacteria were removed from the biofilm, resulting in clean and ready-to-use membranes. Methods were based on the use of extreme pH values followed to washing steps and sterilization. To evaluate the results, the membranes were photographed using an inverted optical microscope. The thickness of the membrane was measured using a caliper, and the loss of water of the membrane was calculated. These parameters were also measured before the cleaning tests. The microscopic comparison showed that after the treatment the membrane did not present cellular debris or residues. Regarding the thickness of the membrane and the loss of water, no relevant alteration was observed for both evaluations. In addition, the viability of fibroblasts cultured on the recovered membranes was evaluated. The method tested was considered useful for recovering membranes for new application, and this is of great relevance considering the cost, time, resource and infrastructure required for the production of biofilms as biotechnological material for application in tissue engineering.

Keywords: Bacterial nanocellulose membranes. Scaffold reuse. Tissue engineering. Biofilms.

1 INTRODUÇÃO

A Engenharia de Tecidos (ET) surgiu na intersecção de numerosas disciplinas a fim de atender a uma necessidade clínica global de tecnologias para promover a regeneração de tecidos e órgãos funcionais. Emprega os princípios dos campos da ciência dos materiais, da biologia celular, do transplante e da engenharia em um esforço para tratar ou substituir tecidos danificados. É considerada uma tecnologia biomédica promissora que ajuda e aumenta a reparação e a regeneração de tecidos deficientes e lesionados (BERTHIAUME et al., 2011).

Uma característica importante para a engenharia de tecidos é o ambiente celular que imita alguns aspectos críticos do tecido *in vivo*, essa configuração é feita através do controle adequado dos materiais e do ajuste mecânico. Persuadir células a formar tecidos é inerente ao processo de engenharia, já que as células precisam de suporte físico (normalmente na forma de suporte 3D), bem como químico; assim, sinais mecânicos são

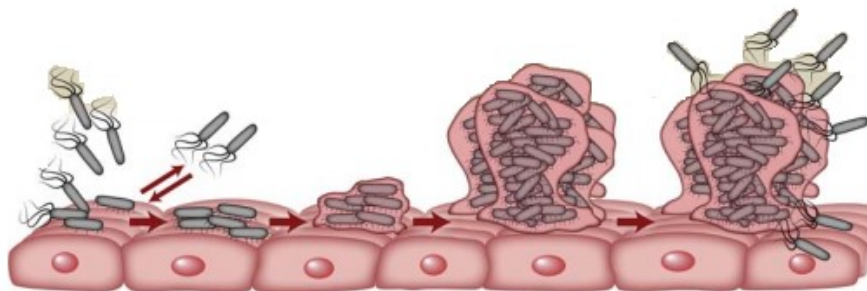
fornecidos em tempos e locais para formar as estruturas que caracterizam o tecido nativo (GRIFFITH, 2002).

Um dos órgãos estudados pela ET é a pele, objetivando construir peles artificiais para o tratamento de feridas. A pele é organizada em uma estrutura de camadas celulares consistindo da epiderme e da derme. Várias camadas de queratinócitos fazem parte da epiderme. Na derme encontra-se a matriz extracelular e alguns componentes celulares, como os fibroblastos. As células que compõem o tecido da pele humana crescem dentro de uma matriz tridimensional (3D). Desse modo a engenharia de tecidos deve basear-se em *scaffolds* em 3D para o crescimento do tecido (PITTELLA, 2017).

Devido às características necessárias compatíveis, as membranas de nanocelulose bacteriana (BNC – *bacterial nanocellulose membranes*) se apresentam como *scaffold* adequado para o desenvolvimento de células epiteliais, sendo uma possível solução para queimaduras e deficiências graves na pele. A membrana de nanocelulose bacteriana é uma forma de celulose natural que apresenta estrutura nanofibrosa sintetizada por certas bactérias, incluindo a bactéria *Gluconacetobacter hansenii*. A membrana caracteriza-se como um biofilme: uma matriz polimérica (polissacarídeo formado por homopolímero linear de glicose) sintetizada por uma colônia de bactérias para sua própria proteção (PITTELLA; PORTO, 2015).

A formação do biofilme ocorre por uma série de eventos sequenciais, em que a adesão inicial de bactérias planctônicas à superfície (processo reversível) é seguida por subsequente proliferação e acúmulo de camadas de células e, finalmente, pela formação da comunidade microbiana (processo irreversível) embebida em matriz de exopolissacarídeo produzida por si mesma (COSTA et al., 2016), conforme mostrado na Figura 1.

Figura 1 - Formação do biofilme bacteriano.



Fonte: Saleemi (2018).

A BNC destaca-se devido as suas propriedades físico-químicas, como elevada capacidade de retenção de água; resistência à tração e à temperatura; biocompatibilidade; moldabilidade; e flexibilidade da rede de nanofibras. Dessa maneira, ela é um ambiente propício para adesão e proliferação de células epiteliais, de maneira que tem sido usada como *scaffold* para a cultura celular (WATANABE; KONDO, 2012).

É notória a importância de estudos e usos clínicos da BNC; entretanto, os recursos gastos para produção da BNC são significativos, tornando essencial a ideia de reutilizá-las. Reciclar ou reaproveitar é tornar a usar o que já foi usado – em alguns casos, infinitas vezes (CMRR, 2008). Diante dos impactos causados ao ambiente pela ação do ser humano, e da noção de finitude dos recursos, a reciclagem foi uma das alternativas encontradas na busca por um equilíbrio entre captação, produção e consumo (LOMASSO et al., 2015).

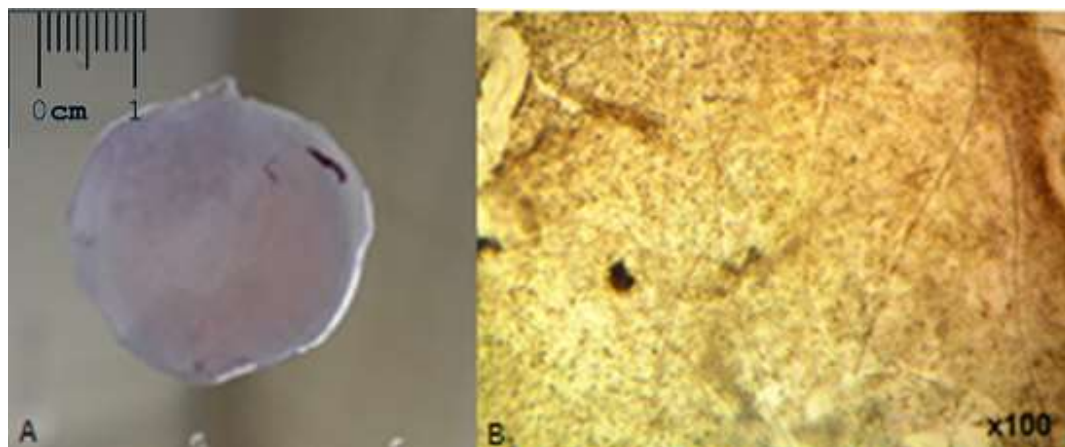
Dessa maneira, o objetivo do projeto foi avaliar metodologias para a reutilização de membranas de nanocelulose, e assim evitar o desperdício de material e tempo para o preparo de novas membranas.

2 METODOLOGIA

Uma revisão bibliográfica foi realizada a partir do estudo de três artigos que discutem o uso de biofilmes para o tratamento de feridas, além do protocolo de purificação das membranas já realizado pelo Laboratório de Tecnologias Integradas da Universidade Federal de Santa Catarina (INTELAB/UFSC), que produz a membrana de nanocelulose bacteriana. Nesse protocolo foram encontradas técnicas de limpeza das membranas, que são reproduzidas quando é necessário retirar as bactérias das membranas por elas sintetizadas (PITTELLA, 2017).

Em sequência, as membranas foram coletadas após terem sido usadas em testes *in vitro* como *scaffold* celular em ensaio de viabilidade celular para projeto de doutorado (PITTELLA, 2017). As membranas foram usadas para cultivar fibroblastos por 48 horas, e foi aplicado, além de meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino, o reagente MTT. Elas foram separadas em três grupos e fotografadas para registro de suas características macroscópicas iniciais (Figura 2A). Também foram analisadas pelo microscópio óptico invertido e fotografadas para registrar as características microscópicas iniciais (Figura 2B).

Figura 2 - Membrana de nanocelulose bacteriana a ser recuperada



A = características macroscópicas; B = características microscópicas.

Fonte: próprio autor.

As membranas foram submetidas à imersão completa em hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M, a 50° C, sob agitação, por tempos diferentes, conforme mostra a Tabela 1. Após isso, as membranas foram retiradas e lavadas com água destilada até a obtenção de pH = 7,0. Em seguida, foram emersas em água destilada e autoclavadas em 125° C por 40 minutos. Após o tratamento, foram realizadas análises macroscópica, microscópica e de perda de massa. Além disso, foram cultivados fibroblastos da linhagem celular L929 na membrana e então foi feito um ensaio de viabilidade celular utilizando o kit MTS Proliferation Kit (Abcam), de acordo com Pittella e Porto (2015).

Tabela 1 - Grupos e seus tratamentos.

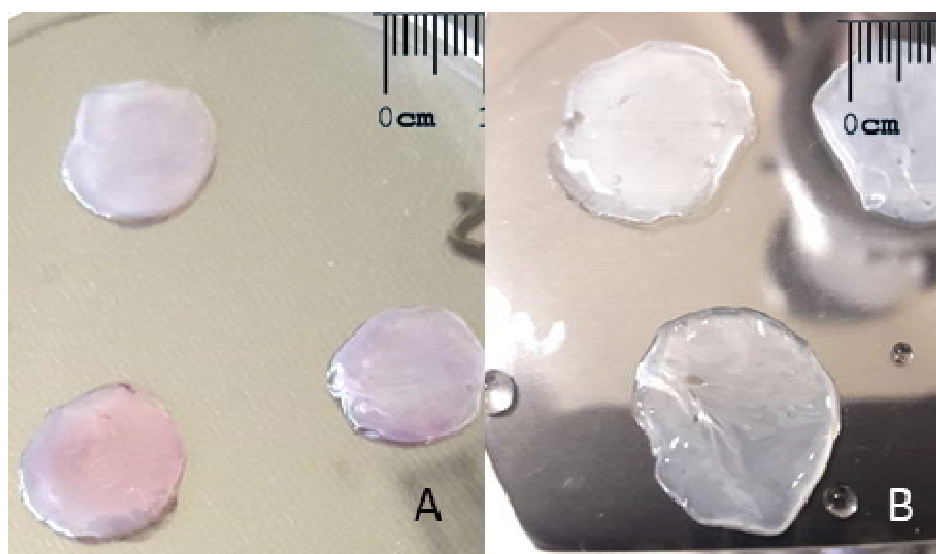
Grupos	Tratamento
1	Imersão em solução de NaOH 0,1 mol/L a 50° C por 24 horas
2	Imersão em solução de NaOH 0,1 mol/L a 50° C por 15 horas
3	Imersão em solução de NaOH 0,1 mol/L a 50° C por 6 horas

Fonte: próprio autor.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma análise qualitativa foi realizada considerando os aspectos macroscópicos e microscópicos anteriores e posteriores ao tratamento. É possível verificar que antes do tratamento as membranas eram opacas e escuras macroscopicamente (Figura 3A) e após o tratamento (Figura 3B) se tornaram translúcidas e incolores. Quanto ao aspecto microscópico, após o tratamento havia poucas sujidades aparentes em comparação ao estado inicial. As Figuras 4–6 mostram a análise dos três grupos.

Figura 3 - A = imagem da membrana antes do tratamento; B = imagem da membrana após do tratamento



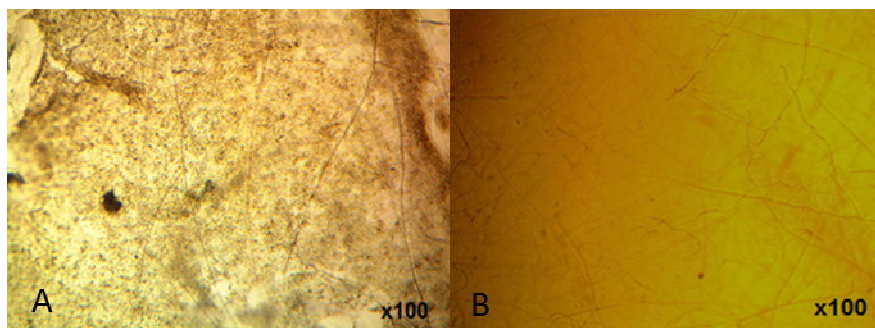
Fonte: próprio autor.

Com relação à perda de massa, os dados apresentados na Tabela 2 mostram que não houve alteração significativa pós-tratamento.

Tabela 2 - Média de massa das membranas para o teste de perda de massa

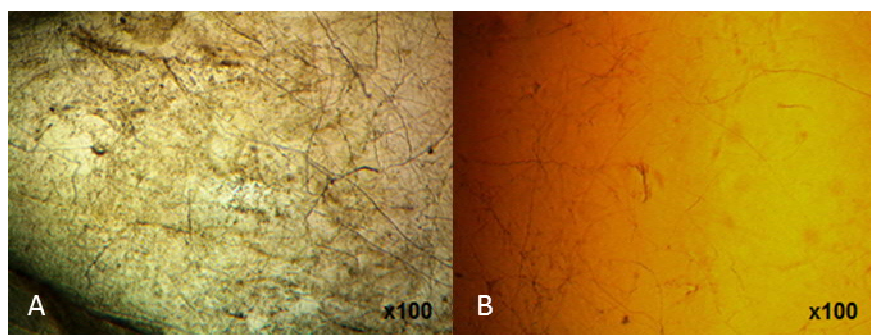
Grupos	Anterior ao tratamento	Posterior ao tratamento
1	0,083 g \pm 0,010	0,090 g \pm 0,011
2	0,109 g \pm 0,018	0,115 g \pm 0,019
3	0,079 g \pm 0,006	0,074 g \pm 0,005

Figura 4 - Grupo 1: A = antes do tratamento; B = após o tratamento.



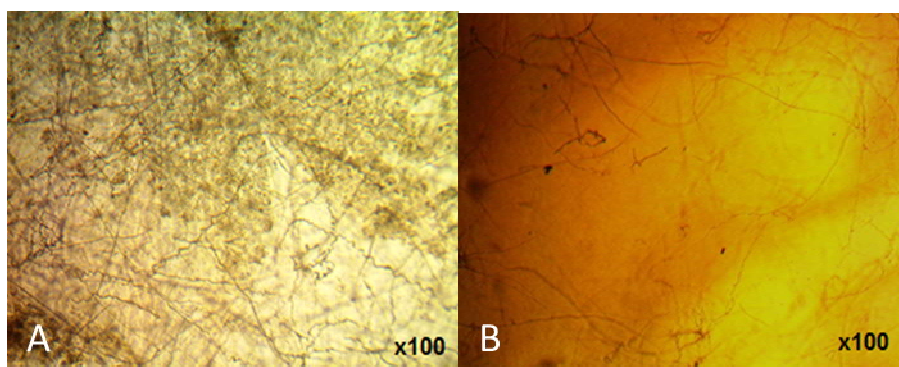
Fonte: Próprio autor.

Figura 5 - Grupo 2: A = antes do tratamento; B = após o tratamento.



Fonte: Próprio autor.

Figura 6 - Grupo 3: A = antes do tratamento; B = após o tratamento



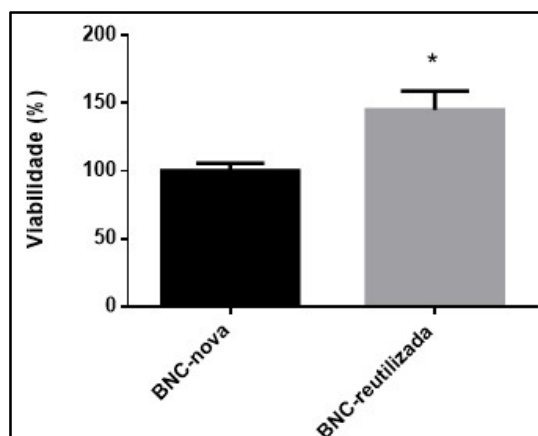
Fonte: Próprio autor.

As imagens 4A, 5A e 6A mostram manchas escuras que são restos de células mortas e resíduos de experimentos; já as imagens 4B, 5B e 6B não apresentam tais

resíduos, que sugere eficiência na limpeza pelos procedimentos utilizados.

Em adição, foi realizado o teste de viabilidade celular, como mostra a Figura 7. Após 24 horas de cultivo de fibroblastos nas membranas recuperadas, foi observada diferença estatisticamente significativa na viabilidade dos fibroblastos cultivados em ambos grupos de membranas. De maneira notável, houve proliferação significativa de fibroblastos nas membranas recuperadas, provavelmente devido à interação prévia dos mesmos tipos celulares na membrana recuperada. No entanto, para elucidar o resultado observado, análise química abrangente da composição pós-tratamento é necessária.

Figura 7 –Viabilidade celular de fibroblastos L929 cultivados nas membranas de nanocelulose novas (BNC-nova) e nas membranas recuperadas (BNC-reutilizada). Teste t Student (* p=0,0002).



Fonte: Próprio autor.

Trabalhos prévios com BNC (PERTILE et al., 2010; PITTELLA; PORTO, 2015; PITTELLA, 2017) indicam que a metodologia aplicada para a obtenção de membranas de BNC estéreis poderia ser utilizada também para limpeza, visando à reutilização. Isso ocorre porque as nanofibras se mostram resistentes à degradação, mesmo quando submetidas a condições rígidas, como processos de esterilização (SOUZA et al., 2018).

4 CONCLUSÃO

Através dos dados obtidos, conclui-se que o tratamento de 6 horas se mostrou tão efetivo quanto o de 15 e o de 24 horas, sendo definido como o protocolo de limpeza e possível reuso das membranas com menor tempo de execução. Essa metodologia evita o desperdício de material e de tempo de preparo de novas membranas, além de dar suporte ao uso clínico e em pesquisas da BNC. Como perspectiva, sugere-se maior

elucidação química da composição das membranas recuperadas. Desta forma, novos ensaios poderiam ser realizados como a co-cultura de diferentes subtipos celulares presentes na pele e possíveis testes *in vivo*.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Faculdade de Farmácia e à Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (PROPP/UFJF) por possibilitar e dar suporte ao estudo desenvolvido. Agradecemos também à infraestrutura e à supervisão geral fornecida pelo Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNano); ao Dr. Frederico Pittella, pela orientação; e à Dr^a. Camila Quinetti Paes Pittella, pelo suporte científico durante todo o projeto. Os autores agradecem ao Laboratório Integrado de Pesquisa (LIP) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFJF (PPGCBIO-UFJF) pelo suporte em uso de equipamento.

REFERÊNCIAS

- BERTHIAUME, F.; MAGUIRE, T. J.; YARMUSH, M. L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. **Annu Rev Chem Biomol Eng**, v. 2, p. 403-430, 2011.
- CENTRO MINEIRO DE REFERÊNCIA EM RESÍDUOS. **Curso de gestão e negócios de resíduos**. Belo Horizonte: W3 Propaganda, 2008.
- COSTA, K. A. D. et al. Formação de biofilmes bacterianos em diferentes superfícies de indústrias de alimentos. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 71, n. 2, p. 75-82, abr./jun., 2016.
- DINI, V.; BERTONE, M.; ROMANELLI, M. Prevention and management of pressure ulcers. **Dermatologic Therapy**, v. 19, n. 6, p. 356-364, nov./dez. 2006.
- FONTANA, J. D. et al. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **ApplBiochemBiotechnol**, v. 24-25, p. 253-64, Spring-Summer 1990.
- GRIFFITH, L. G. Tissue Engineering-Current. Challenges and Expanding Opportunities. **Science**, v. 295, n. 557, p. 1009-1014, 2002.
- LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-6, maio 1993.
- LOMASSO, A. L. et al. Benefícios e desafios na implementação da reciclagem: um estudo de caso no centro mineiro de referência em resíduos (CMRR). **Revista Pensar Gestão e Administração**, v. 3, n. 2, jan. 2015.
- MÜLLER, F. A. et al. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering.

Biomaterials, v. 27, n. 21, p. 3955-3963, jul. 2006.

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

PITTELLA, C. Q. P. **Desenvolvimento de scaffold de nanocelulose bacteriana com modificação de superfície para aplicações tópicas**. 2017. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

PITTELLA, C. Q. P.; PORTO, L. Application of bacterial nanocellulose membranes for epithelial tissue repair. **REV. Enf-UFJF**, v. 1, n. 2, p. 223-232, dez. 2015.

PRIYA, S. G.; JUNGVID, H.; KUMAR, A. Skin Tissue Engineering for Tissue Repair and Regeneration. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 14, n. 1, p. 105-118. 2008.

SOUZA, S. S. et al. Nanocellulose biosynthesis by *Komagataeibacterhansenii* in a defined minimal culture medium. **Cellulose**, p. 1-15, 2018.

SALEEMI, M. A.; PALANISAMY, N.; WONG, E. Alternative Approaches to Combat Medicinally Important Biofilm-Forming Pathogens. *In*: SALEEMI, M. A.; PALANISAMY, N.; WONG, E. **Alternative Approaches to Combat Medicinally Important Biofilm-Forming Pathogens, Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods**. Sahra Kirmusaoğlu: IntechOpen, 2005. p.7. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/antimicrobials-antibiotic-resistance-antibiofilm-strategies-and-activity-methods/alternative-approaches-to-combat-medicinally-important-biofilm-forming-pathogens>. Acesso em: 17 dez. 2019.

WATANABE, M.; KONDO, S. Changing clothes easily: connexin regulates skin pattern variation. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 25, n. 3, p. 326-30, maio 2012