

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



*Estudo da adesão de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical
sobre biopolímero da cana-de-açúcar*

MESTRANDO: Alberto dos Santos Fragoso

ORIENTADOR (*in memorian*): Prof. Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov

ORIENTADORA: Prof. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Márcia Bezerra da Silva

RECIFE, 2013

ALBERTO DOS SANTOS FRAGOSO

*Estudo da adesão de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical
sobre biopolímero da cana-de-açúcar*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, em fevereiro de 2013.

ORIENTADOR (*in memorian*): **Prof. Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov**

ORIENTADORA: **Prof. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira**

CO-ORIENTADORA: **Profa. Dra. Márcia Bezerra da Silva**

RECIFE, 2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Fragoso, Alberto dos Santos

Estudo da adesão de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical sobre biopolímero da cana-de-açúcar/ Alberto dos Santos Fragoso Recife: O Autor, 2013.

95 folhas : il., fig., tab.

Orientadores: Oleg Vladimirovich Krasilnikov e Maria Danielly Lima de Oliveira

Coorientadora: Márcia Bezerra da Silva

Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2013.

Inclui bibliografia

- 1. Tecidos (anatomia e fisiologia) 2. Cana de açúcar 3. Células-tronco I. krasilnikov, Oleg Vladimirovich (orientador) II. Oliveira, Maria Danielly Lima de (orientadora) III. Silva, Márcia Bezerra da (coorientadora) IV. Título**

611.018 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 206

ALBERTO DOS SANTOS FRAGOSO

"Estudo da adesão de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical sobre biopolímero da cana-de-açúcar"

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final exigido para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração Biotecnologia.

Data de Aprovação: ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr.^a **Maria Danielly Lima de Oliveira**- (Orientador/UFPE)

Prof. Dr. **César Augusto Souza de Andrade**- (UFPE)

Prof^a. Dr.^a **Maira Gaudino da Rocha Pitta** - (UFPE)

Dedicatória

*Ao dedicar essa dissertação, pensei em retribuir a quem sempre me dedicou carinho, apoio, compreensão, confiança e incentivo. A minha querida e saudosa mãe que esta no céu, e que mesmo antes de tudo, quando eu ainda era criança, plantou em mim o gosto e a responsabilidade no estudo. A minha avó que tanto contribuiu para a minha formação. Dedico esse trabalho a vocês, e agradeço por sempre me compreenderem e pelo amor oferecido de forma incondicional. Agradeço também ao meu pai por toda sua cordialidade para comigo. Ao meu irmão Arthur por tudo. A vocês agradeço por me incentivar a buscar os caminhos que busquei, mesmo que para isso sacrificássemos os nossos encontros. A Waleska, minha linda, que durante esse ciclo passou de namorada á noiva e agora é minha esposa. Dedico com muito amor a você, ãLindonaõ, obrigado por me apoiar e por acreditar no meu potencial e, sobretudo, por ter colocado mais amor na minha vida. A toda minha família, Tias Tios e primos que são testemunhas de minha história e acima de tudo são minha eterna fortaleza.
Mãe você faz falta!*

Agradecimentos

Ao Senhor meu Deus pela dádiva de ter nascido em uma família maravilhosa.

A minha Mãe que tanto me incentivou e apoiou em todas as minhas escolhas, e que partiu tão cedo deixando tantas saudades sem ela eu não seria nada e nem estaria aqui.

O meu muito obrigado ao querido orientador professor Oleg Vladimirovich Krasilnikov (*In Memoriam*) pela oportunidade de conhecer o mundo das pesquisas científicas, bem como pela confiança depositada em minha pessoa.

Às Professoras Márcia Bezerra da Silva, e Maria Danielly Lima de Oliveira por terem confiado em mim durante a realização deste trabalho e por terem me aceitado como aluno e orientando mesmo após a perda que sofremos.

Ao professor Reginaldo Pereira pelas boas ideias, e ao Professor Cláudio Gabriel por todo suporte técnico e estrutural.

À Professora Maria Tereza dos Santos Correia pela atenção e colaboração nos momentos difíceis.

Aos Professores César Augusto Souza de Andrade e Fernando Costa e Silva Filho pela colaboração fundamental para a concretização deste trabalho.

Ao Professor José Lamartine de Andrade Aguiar, por fornecer as amostras do biopolímero da cana ó de-açúcar.

Aos profissionais do CETENE: Euclides (AFM); Edwin (FTIR).

À Liliya Yuldasheva pela atenção, preocupação e apoio e Diego pela ajuda técnica. À Jean e Artur pelo suporte na cultura de células.

À todos que compartilham o Laboratório de Biofísica de Membranas e Células Tronco. Layse, Anielle, Thuani, Manuela, Janilson, Djanah, Darlene, Gisely, Juliana, Maria Carolina.

À Fredson que anima qualquer pessoa.

Aos meus pais Vera (*In Memoriam*) e Alberto, meus pilares.

À minha avó Wanda por esta base sólida.

A minha melhor amiga, fã, companheira, motivadora, e agora esposa, Waleska Fragoso (Leka). Seremos Muito Felizes! Muito Obrigado.

À FACEPE pelo suporte financeiro necessário para a realização desta dissertação.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I ó INTRODUÇÃO

1.1 Introdução.....	14
---------------------	----

CAPÍTULO II - OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral.....	17
-------------------------	----

2.2 Objetivos Específicos.....	17
--------------------------------	----

CAPÍTULO III ó REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ó Biomateriais como suportes (arcabouço) em engenharia de tecidos.....	18
--	----

3.2 ó Biodegradação, bioabsorção e bioreabsorção de materiais poliméricos.....	21
--	----

3.3 ó Biomateriais poliméricos naturais.....	23
--	----

3.4 ó Exopolissacarídeos bacterianos.....	32
---	----

3.4.1 ó Biopolímero da cana-de-açúcar.....	36
--	----

3.4.2 ó Aplicações biotecnológicas do biopolímero da cana-de-açúcar.....	38
--	----

3.5 ó Cultivo de células tronco e engenharia de tecidos.....	40
--	----

3.5.1 ó Suportes para crescimento de células tronco.....	43
--	----

3.6 ó Técnicas de caracterização.....	44
---------------------------------------	----

3.6.1 ó Microscopia de força atômica (AFM) e Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	44
---	----

3.6.2 ó Espectroscopia de Infravermelho derivada de Fourier ó FTIR47

3.6.3 ó Espectroscopia de impedância elétrica e estudo de células-tronco.....48

3.7 ó Referências Bibliográficasí í í í í í í í í í í í í .í í í .í50

CAPÍTULO IV

3.8 ARTIGO61

CAPÍTULO V

3.9 CONCLUSÕES97

3.10. PERSPECTIVAS98

3.11. ATIVIDADES REALIZADAS PELO ALUNO99

RESUMO

As células tronco mesenquimais (CTM) têm sido estudadas extensivamente como uma potencial fonte de células para a engenharia de tecidos. A busca por novos biomateriais naturais é de grande interesse pra atuar como suporte para o desenvolvimento de tecidos. Assim, o biopolímero da cana-de-açúcar (BCA) torna-se um material atraente para os enxertos biológicos por ser um polímero rico em ácido glicurônico, possuir elasticidade, resistência à tração e flexibilidade. O filme BCA, apresenta topografia bastante irregular, desta forma, ora são visualizadas estruturas como uma malha trançada, ora são vistos picos e vales. O espectro de infravermelho mostrou que o BCA tem a estrutura de um polissacarídeo apresentando ligações C-O-C; C-H; C-H-O; características de carboidrato, e apresentando faixas de absorção de infravermelho que vão de 1200 e 900 cm^{-1} . Os resultados de espectroscopia de impedância elétrica (EIE) mostraram que os valores médios da resistência à transferência de elétrons (R_{et}) dos filmes de SCB, foram de 24 M Ω , mostrando que a película do BCA impede a passagem de elétrons entre a solução e o eletrodo de metal. O valor médio do sistema de R_{et} de BCA-CTM foi superior ao sistema BCA sem células, o que reflete uma obstrução na passagem de elétrons. Após a obtenção do sistema BCA-CTM houve uma mudança de ângulo de fase para frequências mais altas, devido à adesão de MSC. Desta forma, o SCB provou ser uma matriz biocompatível para o crescimento de células tronco mesenquimais e é um biomaterial promissor para a engenharia de tecidos.

Palavras-chave: biopolímero; polissacarídeo, espectroscopia de impedância; células tronco.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) have been extensively studied as a potential source of cells for tissue engineering. The search for new natural biomaterial is of great interest as supports for developing tissues. Thus, the sugarcane biopolymer (SCB) is an attractive material for biological grafts for being a polymer rich in glucuronic acid, present elasticity, tensile strength and flexibility. SCB film consists of regions marked by a dimple on the surface of the sample, a sequence of ridges and valleys, reflecting the characteristic of fibers on the surface. The infrared spectrum showed that the SCB has the structure of a polysaccharide with C-O-C bond, characteristic of carbohydrate between 1200 and 900 cm^{-1} , confirming the link between the monomers forming the polymer. The results of electric impedance spectroscopy (EIS) showed that the average values of the electron transfer resistance (R_{et}) of the SCB films was 24.00 M Ω , showing that the film prevents the passage of electrons between the solution and the metal electrode. The average value of the system to R_{et} of SCB-MSC was higher than SCB without cells, which reflected a blockage in the passage of electrons. After obtaining system SCB-MSC there was a phase angle shift to higher frequencies due to adhesion of MSC. SCB proved to be biocompatible matrix for growing mesenchymal stem cells and is a promising biomaterial for tissue engineering.

Keywords: biopolymer; polysaccharide; impedance spectroscopy; stem cells.

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E ABREVIATURAS

<i>Figura 1</i> ó Estrutura química da quitina (a) e da quitosana (b).	24
<i>Figura 2</i> ó Estereoisômeros do ácido láctico.	28
<i>Figura 3</i> ó Lactídeo (monômero cíclico do ácido láctico)	30
<i>Figura 4</i> ó Estrutura molecular do polihidroxibutirato.....	31
<i>Figura 5</i> ó Representação estrutural do exopolissacarídeo pululano	35
<i>Figura 6</i> ó Esquema de produção de pululana a partir de <i>A. pullulans</i>	36
<i>Figura 7</i> ó <i>Zoogloea sp.</i> a partir do melão da cana-de-açúcar.....	37
<i>Figura 8</i> ó Curativo a partir de melão da cana-de-açúcar	38

LISTA DE FIGURAS, TABELAS DO ARTIGO

Figure 1. Schematic representation of the MSC adhesion and measurements.

Figure 2. Infrared spectra of sugar cane biopolymer film.

Figure 3. 3D (a) and 2D (b) AFM topographic image ($5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$) of the SCB. A section analysis along the black line in image (b) shows that the step height (c) between higher and lower levels is approximately 259 nm.

Figure 4. Nyquist plots of the SCB at different applied potentials: SCB1 (a), SCB2 (b) and SCB3 (c).

Figure 5. Bode plots of the SCB at different applied potentials: SCB1 (a), SCB2 (b) and SCB3 (c).

Figure 6. Equivalent circuit adopted to fit the impedance data, where R_s is the ohmic resistance of the solution, C_{dl} the capacitance double layer, W the Warburg impedance and R_{ct} the resistance to passage of electric current.

Figure 7. Nyquist plots of the steps of cellular adhesion, before and after SCB exposition to MSC: SCB (), SCB-MSC 0.2V (\hat{e}), SCB-MSC 0.4V (), SCB-MSC 0.6V (\times), SCB-MSC 0.8V () and SCB-MSC 1.0V (). Solid lines correspond to the fitting using the obtained Randles parameters.

Figure 8. $\Delta R_{ct}\%$ of SCB-MSC adhesion process at different potentials.

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM ó Microscopia de força atômica

BPCA ó Biopolímero da cana ó de ó açúcar

CT ó Células Tronco

CTAs ó Células tronco adultas

CTE ó células tronco embrionárias

CU ó Cordão umbilical

EIE ó Espectroscopia de impedância eletroquímica

EPS ó Hetero polissacarídeo

FTIR ó Espectrometria de infra-vermelho com transformada de Fourier

fCTMs ó Células tronco mesenquimais fetais

GD ó Grau de desacetilação

MEC ó Matriz extracelular

MEV ó Microscopia eletrônica de varredura

Mr ó Massa relativa

MSC ó Células tronco mesenquimais

PHB ó Polihidroxibutirato

PHAóPolihidroxialcanoatos

PLA - Poli (ácido láctico)

PLLA - Ácido Poliláctico.

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é uma nova área tecnológica que visa reparar e ou regenerar tecidos danificados com a adição de biomateriais (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, etc.) combinados com células e fatores estimulantes apropriados. A engenharia de tecidos tem sido considerada como uma potencial alternativa ao transplante de órgãos (CAIA *et al.*, 2005).

Os biomateriais são considerados uma alternativa viável para o restabelecimento das funções normais do paciente e a depender do tempo de permanência no corpo humano, os implantes podem ser classificados em dois grandes grupos, permanentes ou temporários.

Os implantes permanentes podem desencadear processos crônicos de inflamação, sendo uma resposta tipicamente fisiológica a um corpo estranho, mas que podem conduzir a complicações clínicas mais severas, como a contração tecidual. Dentre os materiais utilizados como implantes, os polímeros apresentam um bom potencial de uso, pois são, geralmente, fáceis de produzir, manusear e apresentam características mecânicas semelhantes aos dos materiais biológicos (GRIFFITH, 2000).

O impulso para a pesquisa em implantes biodegradáveis adveio na década de 1960, período em que os implantes temporários (confeccionados de polímeros bioreabsorvíveis) passaram a ser utilizados em grande número de aplicações na área médica sendo utilizados em suturas cirúrgicas (KULKARNI *et al.*, 1966), sistemas para liberação controlada de drogas (LIU E BHATIA, 2004), *stents* (VALIMAA E LAAKSOVIRTA, 2004) e dispositivos ortopédicos (AMBROSE E CLANTON, 2004).

Atualmente a reconstituição e tratamentos de injúria de tecidos são objetivos da terapia celular e respectivo. Há muitas tentativas de construir suportes em três dimensões 3D adequados, (nichos) para células tronco progenitoras com finalidade de reconstituir/regenerar os tecidos (GRIFFITH, 2000).

A idéia básica da engenharia de tecidos no campo de pesquisa voltada para a engenharia óssea é a formação de um novo osso *in vitro* ou *in vivo* através da combinação de materiais osteocondutivos, células osteopontentes e fatores de crescimento apropriados. A restauração da funcionalidade de ossos humanos utilizando técnicas de engenharia óssea requer freqüentemente o uso de suportes porosos temporários. O primeiro passo para a reconstrução de um órgão ou tecido é a seleção do suporte, os quais podem ser poliméricos, metálicos ou cerâmicos (LORCAN, *et al.*, 2006).

Vários materiais sintéticos e naturais foram testados como estratégia para a criação de um ambiente 3D apropriado (MAQUET *et al.*, 2004; TROJANI *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2009; NAIR *et al.*, 2009; RENTSCH *et al.*, 2010; WANG & YU, 2010; WU *et al.*, 2010a; ZHANG *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2010). Idealmente, o ambiente projetado deve permitir que as células se sintam em seu habitat natural, se proliferem e secretem matriz extracelular própria, paralelamente com a degradação e reabsorção de material projetado (“arcabouço”).

Os polímeros biodegradáveis vêm sendo amplamente utilizados na construção de suportes porosos aplicados à engenharia de tecidos, incluindo a de ossos e outros tecidos mineralizados (HUTMACHER, 2000). A aplicação destes materiais na área médica depende da biocompatibilidade que é definida como: a habilidade do material executar uma resposta tecidual apropriada a uma aplicação específica (MEYER, *et al.*, 2003).

O ácido poliglicólico e seus derivados foram explorados mais frequentemente como material sintético biodegradável semeado com as células em tentativas da regeneração nos modelos *in vitro* e *in vivo* (MAQUET *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2010a; SABER, 2009; KIM *et al.*, 2010; ZHANG & YELICK, 2010; ZHANG *et al.*, 2010).

No presente momento, não existem *arcabouços* engenheirados que reproduzam completamente todas as características do tecido a se reparar. Mas eles devem possuir algumas características essenciais, que incluem: facilidade de manuseio e aplicação no local do ferimento; fornecer função de barreira vital com fluxo de água adequado; ser facilmente aderente; dispor de propriedades físicas e mecânicas próximas as naturais; sofrer degradação controlada, ser estéril, não tóxico, não antigênico, facilitar a angiogênese, e provocar a mínima reação inflamatória. O objetivo final do tecido engenheirado é satisfazer a maioria se não todos estes critérios (METCALFE & FERGUSON, 2007).

Dentre os polímeros disponíveis para aplicação em engenharia de tecidos, destaca-se o polissacarídeo produzido por *Zoogloea* sp., isolado a partir de melão de cana-de-açúcar. Este polissacarídeo é composto por resíduos de D -glicose, D -galactose e ácido pirúvico, destacando-se, por exemplo, em aplicações industriais, no desenvolvimento de pele artificial e membranas de filtro (CAVALCANTE, CARVALHO & CARNEIRO-DA-CUNHA, 2006). Desta forma, o biopolímero da cana-de-açúcar além de apresentar potenciais aplicações industriais, vem se tornando um candidato promissor como *arcabouço* para crescimento de células.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar o polímero biodegradável obtido da cana-de-açúcar como matriz para crescimento de células-tronco e diferenciação das células-tronco mesenquimais (CTM).

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar as características morfológicas do biopolímero da cana-de-açúcar (BPCA) por meio da Microscopia eletrônica de varredura;
- Determinar da espessura média do biopolímero;
- Avaliar do crescimento das células-tronco mesenquimais;
- Construir da célula para estudo por meio da Espectroscopia de impedância elétrica (EIE);
- Caracterizar do filme biodegradável da cana-de-açúcar (BPCA) e do sistema BPCA/células-tronco mesenquimais por meio da EIE;
- Avaliar as respostas impedanciométricas do filme BPCA e sistema BPCA/células-tronco mesenquimais por meio das análises da capacitância da dupla camada elétrica (Cdl) e da resistência de transferência de elétrons (Ret);
- Simular dos dados obtidos de EIE por meio do programa EQUIVCRT.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biomateriais como suportes (arcabouço) em engenharia de tecidos

Um biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, sintética ou natural, que possa ser utilizada por um período de tempo como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo (HELMUS, 1995).

Os biomateriais podem apresentar natureza distinta, podendo ser representados desta forma por polímeros, metais, cerâmicas e macromoléculas naturais. Atualmente, os materiais poliméricos têm recebido destaque devido à sua vasta aplicabilidade no corpo humano (BLUNK, 2003). Em adição, o termo biomateriais denomina todo material sintético utilizado para substituir partes de um sistema vivo ou que possa estar em contato íntimo com um tecido biológico vivo (VANIN, 2003).

Os biomateriais são importantes para muitas aplicações biomédicas como implantes e próteses, formulações farmacêuticas, agentes de drogas, microarranjos proteicos e engenharia de tecidos (RATNER *et al.*, 2012). Os polímeros sintéticos permanecem como a classe mais versátil de biomateriais por causa da facilidade no controle de sua composição, estrutura e propriedades (METZKE *et al.*, 2005).

Uma estratégia importante para a concepção de novos biomateriais é a construção de polímeros sintéticos a partir de blocos de construção natural, (união de copolímeros, blendas sintéticos com os naturais), apresentando como principais vantagens a biocompatibilidade e biodegradabilidade de materiais naturais e a versatilidade dos sintéticos. Exemplos de biomateriais feitos a partir de blocos de construção naturais

incluem o ácido polilático, poli ácido glicólico, o pseudo-poli(aminoácido), carboidratos devrivados poliésteres. (METZKE *et al.*, 2005). Estes polímeros geralmente apresentam boa biocompatibilidade, e alguns já vêm sendo utilizados em aplicações clínicas importantes, visto que suas propriedades estruturais e diversidade funcional são relativamente ilimitadas, garantindo o desenvolvimento de biomateriais mais versáteis.

O primeiro passo para a reconstrução de um órgão ou tecido visa à seleção do suporte para as células sendo um aspecto importante que deve ser considerado de forma integrada, tanto sob o aspecto da engenharia de materiais e do tipo de tecido e reparo necessário. A seleção do suporte a ser utilizado deve levar em consideração tanto o tipo, quanto o local da lesão, bem como a sua extensão, podendo seguir basicamente duas estratégias básicas de aplicação, quando preparado com polímeros bioreabsorvíveis (HUTMACHER, 2000).

Na primeira estratégia para a aplicação dos polímeros bioreabsorvíveis, o material polimérico deve ser desenvolvido de forma a suportar física e mecanicamente as células, da inoculação até o reimplante no organismo hospedeiro. Desta forma, o implante do conjunto composto pelo polímero e células ocorre com um tecido prematuro formado e o polímero é a seguir remodelado pela degradação *in vivo*, numa razão proporcional entre crescimento celular e à solicitação mecânica. O implante apresenta a função primordial de proporcionar suporte para o crescimento celular e adicionalmente servir como substituto mecânico/estrutural do tecido original até a formação do novo tecido e sua bioreabsorção completa.

Na segunda estratégia o implante ocorre já com o tecido maduro formado, neste processo o suporte polimérico é dimensionado com propriedades mecânicas e tempo de degradação adequado para a inoculação das células até a sua inserção num bioreator, onde ocorrerá a formação do tecido maduro. Durante este processo, as células semeadas

proliferam e secretam matriz extracelular, enquanto o polímero é degradado e reabsorvido gradualmente, permitindo espaço para a proliferação celular e formação do tecido no reator biológico. Pode-se destacar que apenas após a formação do tecido, o implante é inserido no organismo.

O uso de polímeros bioreabsorvíveis como suporte para a cultura de células vem tendo destaque na engenharia de tecidos (KELLOMAKI E TORMALA, 2004).

De modo geral, os biomateriais podem ser classificados quanto a sua bioatividade e biocompatibilidade. A biocompatibilidade é a habilidade de um material desempenhar uma resposta tecidual apropriada em uma aplicação específica. Enquanto que a bioatividade é uma propriedade inerente a alguns materiais de participarem em reações biológicas específicas ou a capacidade que alguns materiais possuem de provocar a ligação com tecidos vivos, sem formar a camada fibrosa que o separa do tecido (WILLIAMS, 1982).

Tendo em vista que a biocompatibilidade é uma propriedade importante para o uso humano de biomateriais, fica evidente a necessidade de se fazer estudos *in vitro* e *in vivo* do comportamento celular na interface com esses materiais. Modelos animais são essenciais para prover informações sobre as reações biológicas de um implante, porém, os resultados podem ser de difícil interpretação a nível celular em função do grande número de complexidade de eventos que estejam ocorrendo.

Abordagens *in vitro* superam essas limitações e representam um sistema válido de análise de resposta celular quanto a morfologia, dano, secreção e proliferação (CRUZ, 1987). Os ensaios *in vitro* são mais rápidos, de baixo custo, não envolvem problemas éticos e simulam o desempenho do material antes da sua implantação. Os testes *in vivo* utilizam procedimentos de implantação, fornecem resultados mais realísticos do comportamento do material e permite o exame de ambas as respostas locais ó tecido e sistêmicas - se presentes. Os testes *in vivo* permitem a seleção final do material indicado

para cada prótese. É no teste *in vivo* que se faz o estudo da resposta inflamatória, aguda e crônica e a relação destas no período tardio, com sucesso ou insucesso do biomaterial (CRUZ, 1987).

3.2 Biodegradação, bioabsorção e bioreabsorção de materiais poliméricos

A biodegradação, bioabsorção e bioreabsorção são também de importância para a escolha de um biomaterial como suporte para crescimento celular e posterior uso como enxerto no organismo alvo.

Os polímeros biodegradáveis são elementos que devido à degradação macromolecular sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Desta forma, estes polímeros podem sofrer o ataque por elementos biológicos de forma que a integridade do sistema seja afetada, formando-se fragmentos ou outros subprodutos de degradação, que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo (VERT *et al.*, 2000).

Além disso, há o interesse em polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos, este tipo de material polimérico apresenta uma degradação através da diminuição de tamanho e são reabsorvidos *in vivo*; ou seja, são materiais que são eliminados por rotas metabólicas do organismo. De modo geral, a bioreabsorção é um conceito que reflete a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação sem efeitos colaterais ao organismo, o que reflete a eliminação total do organismo (BARBANTI *et al.*, 2005).

Podemos citar alguns polímeros sintéticos biodegradáveis e bioreabsorvíveis utilizados como fio de sutura, tais como os polímeros do grupo dos poli(-hidróxi ácidos), representantes de uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos, dos quais fazem parte o poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido

glicólico) (PLGA), poli(-caprolactona) (PCL), seus copolímeros e outros (MIDDLETON e TIPTON, 2000).

Os polímeros bioabsorvíveis são materiais que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição de massa molecular. Em adição, um polímero bioabsorvível pode ser bioreabsorvível se suas macromoléculas são excretadas. O processo de bioreabsorção pelo organismo ocorre quando a biodegradação gera produtos e subprodutos com as características dos metabólitos orgânicos, especificamente os ácidos do Ciclo de Krebs. Após esta etapa de hidrólise, ocorrem algumas modificações como, por exemplo, a oxidação a ácido láctico (para o PLA) e conversão das unidades de PGA em glicina, que por sua vez são convertidos em ácido pirúvico (ALI, *et al.*, 1993). Por sua vez o piruvato se converte em acetil-coenzima A, e em seguida participará das reações do ciclo de Krebs, resultando em CO₂ e H₂O, podendo sua eliminação ser feita através da urina e da respiração e desta forma, o material é reabsorvido e metabolizado.

Nas últimas décadas, têm sido desenvolvido biomateriais que sirvam como suporte físico e atuem como um substrato adesivo para células durante cultura *in vitro* para subsequente implantação. Assim esses biomateriais deverão viabilizar a regeneração do tecido hospedeiro em termos de morfologia e de atividade. Desta forma à medida que um tecido sadio já estivesse consolidado, não haveria necessidade da presença do biomaterial, o qual poderia ser, então, removido ou degradado (ZHAO *et al.*, 2003).

3.3 Biomateriais poliméricos naturais

Dentre os biomateriais poliméricos naturais com características de suportar o crescimento celular destacam-se: Quitosana, Ácido Poli L-Láctico (PLLA), Polihidroxibutirato (PHB), os quais são descritos a seguir:

Quitosana em engenharia de tecidos

A quitosana é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, que em muitos casos as consideram poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado (AZEVEDO *et al.*, 2007).

Quitina e quitosana (Figura 1) são copolímeros constituídos por unidades N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina em proporções variáveis, sendo que o primeiro tipo dessas unidades predomina no caso de quitina, enquanto quitosana é composta predominantemente, por unidades D-glicosamina (KUBOTA *et al.*, 2000).

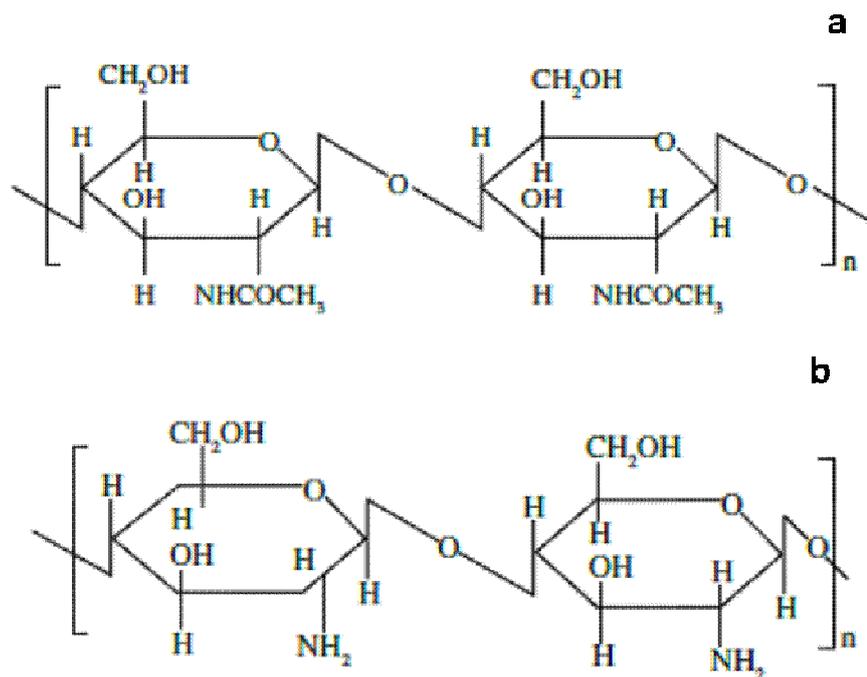


Figura 1- Estrutura química da quitina (a) e da quitosana (b).

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos; sua presença ocorre também em nematóides e parede celular de fungos e leveduras. A quitosana pode ser obtida a partir da quitina por meio da desacetilação com álcalis, podendo também estar naturalmente presente em alguns fungos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (KAFETZOULOS *et al.*, 1993).

O grau de desacetilação (GD) é uma propriedade química muito importante da quitosana, sendo um parâmetro que expressa o conteúdo médio de unidades de N-acetil-D-glicosamina nas cadeias desse biopolímero. Esse parâmetro é capaz de influenciar as características químicas, físicas e biológicas do biopolímero (JIANG, CHEN e ZHONG, 2003). Em geral, o produto *N*-desacetilado da quitina só passa a ser considerado quitosana quando o GD se torna igual ou superior a 60%, percentagem a partir da qual o biopolímero

se torna solúvel em soluções ácidas diluídas. A massa relativa (M_r) da quitosana varia de acordo com a metodologia utilizada em sua preparação e, de forma geral, está compreendida entre 10^4 e 10^6 g mol⁻¹ (ROBERTS, 1992).

As propriedades da quitosana não dependem apenas do seu grau de desacetilação, mas, também da distribuição média dos grupos acetil ao longo da cadeia principal, além do seu peso molecular (AZEVEDO *et al.*, 2007). A versatilidade química da quitosana resulta principalmente da presença dos grupos amino em sua estrutura, os quais oferecem muitas possibilidades de modificações, tais como, *N*-acetilação, *N*-alquilação, *N*-carboxilação, *N*-sulfonação e formação de bases de Schiff com aldeídos e cetonas (SANTOS *et al.*, 2003).

A quitosana é considerada um suporte ideal para imobilização de enzimas, devido ao grande percentual de grupos amino e hidroxila disponíveis em sua estrutura química. Possui facilidade para formação de gel, é hidrofílica, biodegradável, biocompatível e antibactericida. Além disso, é economicamente viável, e bastante empregada na medicina, em produtos farmacêuticos, na agricultura, em biotecnologia, na indústria de cosméticos e de alimentos e, também, como adsorvente na remoção de corantes e no tratamento de efluentes industriais (RAVI KUMAR, 2000). Porém sua maior aplicação é na área biomédica, sendo utilizados em suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, lentes de contato, liberação controlada de drogas em animais e humanos, assim como no encapsulamento de materiais (AZEVEDO *et al.*, 2007).

Recentemente, pesquisadores têm mostrado interesse em novos materiais capazes de serem associados a outras substâncias que favoreçam a formação óssea, especialmente os biopolímeros naturais, em particular a quitosana, que pode apresentar potencial na reparação de defeitos ósseos, a despeito das limitações de outros biomateriais (PARK *et al.*, 2003).

Devido às propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade, este polímero pode atuar como material substituto ósseo que, ao longo do tempo, vai sendo substituído por osso natural. Polímeros de quitosana são constituídos por arranjos paralelos de pontes de hidrogênio que conferem melhores propriedades mecânicas, com alta resistência a cargas, bem como estabilidade ao enxerto, características extremamente importantes especialmente nos estágios iniciais de formação óssea (MUZZARELLI e MUZZARELLI, 2002).

Em adição, os polímeros de quitosana vêm sendo testados com sucesso no tratamento de lesões ósseas periodontais, sucesso esse representado pela neoformação óssea observada histologicamente ou ainda por parâmetros clínicos, como profundidade de sondagem e sangramento à sondagem, e uma grande variedade de testes clínicos realizados para promover os materiais à base de quitosana não reportaram nenhuma reação alérgica ou inflamatória após sua implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão pelo corpo humano (SPIN-NETO *et al.*, 2008).

Nos últimos dez anos, estudos mais específicos mostraram que a união de quitosana e gelatina têm sido bastante interessantes no âmbito da engenharia de tecidos e com grande potencial de aplicação clínica. Em 1998, Eser Elçin e colaboradores demonstraram que associação de gelatina à quitosana aumentou a área de superfície do substrato de cultivo, melhorando a adesão celular e a citocompatibilidade. Mais recentemente, em 2007 a união de ácido hialurônico ao compósito de quitosana e gelatina objetivou em melhorar as propriedades desse compósito, de forma que o procedimento de preparo da matriz através de congelamento e liofilização permitiu a criação de uma matriz 3D porosa, possibilitando o cultivo de queratinócitos e fibroblastos *in vitro*. Esse estudo demonstrou que matrizes 3D de quitosana e gelatina com ácido hialurônico são promissoras para a criação de epitélio de

pele in vitro. Além desses estudos, quitosana e gelatina tem sido aplicadas na engenharia de tecido hepático (JIANKANG *et al.*, 2006), ósseo (MACHADO *et al.*, 2007) e pancreático (YANG *et al.*, 2008), além de servir como substrato para reconstrução da córnea (GAO, *et al.*, 2008) e potencialmente para utilização na restauração do tecido cartilaginoso (Breyner *et al.*, 2009).

Desta forma, os biomateriais de quitosana têm sido considerados como acelerador da reparação tecidual, capazes de aumentar a produção de matriz extracelular através do aumento de produção de fatores de crescimento. Em adição, eles aceleraram a infiltração de linfócitos polimorfonucleares nas fases iniciais de cicatrização tecidual, aumentando consideravelmente a osteopontina, uma fosfoproteína capaz de aumentar a ligação celular na ferida em cicatrização (UENO *et al.*, 2001), sendo de grande interesse em pesquisas de regeneração tecidual.

Ácido Poli L-Láctico (PLLA)

Os polímeros bioabsorvíveis são considerados uma excelente alternativa para o avanço e desenvolvimento de numerosas aplicações na medicina.

O ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico) foi inicialmente encontrado em produtos lácteos fermentados, como iogurte, kefir e queijo cottage. É produzido comercialmente pelo processo de fermentação bacteriana utilizando vários substratos, como milho, batata, beterraba, cana-de-açúcar, produtos lácteos e até mesmo resíduos da agricultura. Como possui uma bifuncionalidade, uma função álcool e uma função ácido carboxílico, podendo o ácido láctico assumir duas configurações opticamente ativas, os isômeros D-ácido láctico e L-ácido láctico (AURAS *et al.*, 2004).

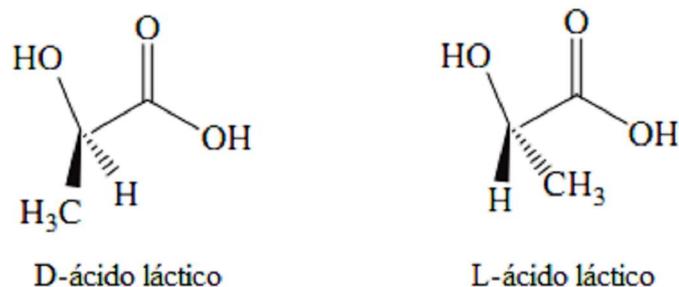


Figura 2- Estereoisômeros do ácido láctico.

O PLLA é um poliéster relativamente hidrofóbico, instável em condições úmida, e biodegradável a subprodutos atóxicos. Pode ser obtido tanto pela polimerização por abertura de anel do dímero cíclico do ácido láctico, o lactídeo, quanto pela reação de polimerização de condensação do ácido láctico (JAHNO, *et al.*, 2006; SINGH, *et al.*, 2010).

Devido à bifuncionalidade do ácido láctico, o lactídeo pode apresentar-se em três formas diastereoisoméricas: L-lactídeo, D-lactídeo e D,L-lactídeo. Assim, através da polimerização por abertura do anel pode-se obter o poli (L-lactídeo) (PLLA), poli (D-lactídeo) (PDLA) e poli (D,L-lactídeo) (PDLLA). As propriedades do PLA encontram-se entre as propriedades do politereftalato de etileno (PET) e do poliestireno (PS) (JAHNO, 2005).

Quanto à degradabilidade, o PLLA é facilmente degradado pelas formas, enzimática e hidrolítica (JAMSHIDIAN, *et al.*, 2010). O PLLA é um dos biopolímeros mais promissores, devido ao fato de que este é produzido a partir de um ácido orgânico natural (Auras *et al.*, 2010). O ácido láctico também pode ser sintetizado por um processo fermentativo de açúcares, obtidos a partir de fontes renováveis como a cana-de-açúcar (JOHN *et al.*, 2009; LUNELLI, 2010).

Por esse motivo, o PLLA pode ser considerado um produto *eco-friendly*, com características de biocompatibilidade adequadas para uso no corpo humano, sendo um material não tóxico (LEONG *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2006; LIU e CZERNUSZKA, 2007; FANG *et al.*, 2005).

PLLA tem numerosas vantagens sobre outros polímeros, incluindo o seguinte: é produzido a partir de recursos renováveis, a sua produção consome menos energia, ele pode ser reciclado de volta para ácido láctico, é atóxico e que ocorrem naturalmente metabólito, através de hidrólise ou alcoólise, sua fabricação emite menos gás de efeito estufa, é compostável, o uso de culturas para a produção de polímeros melhora a economia. As propriedades físicas e mecânicas do PLLA podem ser adaptadas a partir da modificação de sua arquitetura (RUEDA, 2011).

O PLLA é um polímero sintético amplamente conhecido e um dos polímeros biocompatíveis mais promissores utilizados em diversas aplicações biomédicas, devido a sua degradabilidade e absorvibilidade pelo corpo humano. A diversificação de aplicações de PLA é tal que, um único polímero pode ser útil em muitas aplicações, por meio de simples modificações de sua estrutura físico-química e pela propriedade quiral da molécula de ácido láctico (Figura 2), que possui dois centros assimétricos existentes em quatro formas diferentes (RUEDA, 2011).

A partir do ácido láctico pode-se obter o poli (ácido láctico) ou o poli (lactídeo), ambos apresentam a mesma estrutura, diferem-se apenas pelo método de síntese, e são representados pela mesma sigla: PLA. O poli (ácido láctico) é obtido a partir da polimerização por condensação do ácido láctico, sendo esta, uma reação que requer longo tempo e elevadas temperaturas. Já o poli (lactídeo) pode ser obtido pela polimerização por abertura de anel do monômero do ácido láctico, lactídeo, cuja fórmula estrutural é apresentada na Figura 3. (AHMED e VARSHNEY, 2010; DRUMOND *et al.*, 2004).

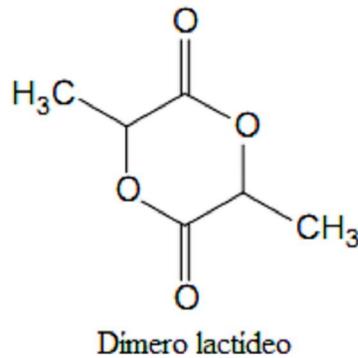


Figura 3- Lactídeo (monômero cíclico do ácido láctico).

O PLA é um polímero termoplástico biodegradável, relativamente hidrofóbico, instável em condições úmidas e biodegradável a subprodutos atóxicos (ácido láctico, CO₂ e H₂O) presentes no metabolismo de animais e microorganismo. O pioneiro na produção do PLA foi Carothers (1932, *apud* JAHNO, 2005), obtendo um polímero de baixa massa molar pelo aquecimento do ácido láctico em vácuo, durante a remoção da água condensada (TOKIWA *et al.*, 2009).

O PLA foi primeiramente utilizado em combinação com poli (ácido glicólico) como material de sutura e vendido sobre o nome de Vicryl nos EUA, em 1974. Desta forma mostrando-se compatível e despertando interesse na área médica (MOTTA & DUEK, 2006).

Poliésteres de ácidos de ocorrência natural, incluindo hidroxi PGA, PLA e PLGA, são amplamente utilizadas em engenharia de tecidos. Estes polímeros ganharam aprovação do FDA para uso humano, e possuem uma grande variedade de aplicações, incluindo fios de sutura. Em adição, alguns estudos mostraram que nanoestruturas fbrosas de PLLA, PCL e poli (L-ácido láctico-caprolactona) (PLCL) apresenta boa adesão para células endoteliais umbilicais humanas (células HUVECs) (SANTOS JR. & WADA, 2007).

Dentre os polímeros biodegradáveis destaca-se o polihidroxibutirato (PHB), que é um poliéster alifático natural (Figura 4) obtido por fermentação bacteriana utilizando fontes de carbono renováveis (HONG, 2006).

Polihidroxibutirato (PHB)

O PHB é um bom material para confecção de suportes porosos devido ao fato de ser citocompatível e de possuir propriedades mecânicas similares às do polipropileno isostático, além de ser biocompatível aos vários tipos celulares, tais como osteoblastos, células epiteliais e condrócitos ovinos (HONG, 2006).

Estudos das propriedades de suportes confeccionados utilizando PHB mostram que células aderem, espraíam e se proliferam sobre a superfície destes. (CAIA *et al.*, 2005).

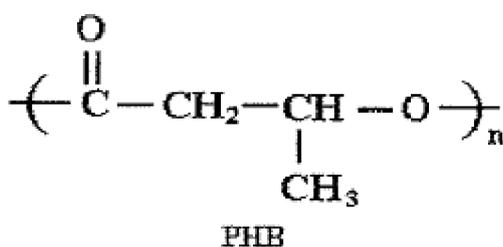


Figura 4- Estrutura molecular do polihidroxibutirato.

O PHB apresenta boa permeabilidade ao oxigênio, boa resistência aos raios ultravioleta, mas é pouco resistente a ácidos e bases. É solúvel em clorofórmio e outros e em outros solventes hidrocarbonetos halogenados. Apesar de sua biodegradabilidade, os PHAs têm boa resistência à água e a vapor e são estáveis sob condições normais de estocagem e durante seu uso. Os ambientes onde o PHB se degrada na ordem da taxa de degradação do mais ativo são: esgotos anaeróbicos, solos úmidos, sedimentos marinhos, esgoto aeróbicos, rumem de gado, água do mar, *in vivo* (subcutâneo ou intramuscular) e *in vitro* a uma taxa lenta (ARKIN *et al.*, 2002).

O PHB tem atraído a atenção industrial, por ser um plástico degradável no meio ambiente, para várias aplicações na agricultura, marinha e aplicações médicas (KOYAMA, 1995) e possui uma velocidade de hidrólise não enzimática bastante pequena (KOYAMA, 1997).

Segundo SHIN, 2007 a crescente demanda por substituição funcional tem permitido a evolução dos biomateriais no sentido de um sistema biointegrado, mas para isso, espera-se que haja biointegração, ou seja, (implante artificial e o ambiente biológico) em perfeita interação, e que os fenômenos observados entre o implante e os tecidos do receptor não induzam nenhum efeito desfavorável. Desta maneira almeja-se obter biomateriais ideais com atributos de superfície e propriedades adequadas (LORCAN *et al.*, 2006).

3.4 Exopolissacarídeos bacterianos

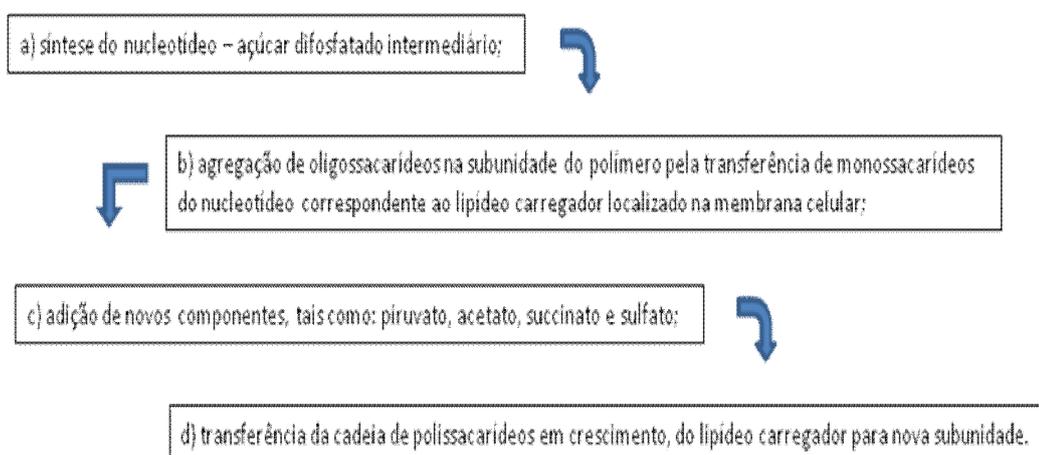
Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de carboidratos encontrados em uma ampla variedade de bactérias, que também possibilitam vida livre a bactéria, permitindo a aderência e colonização de superfícies sólidas onde nutrientes se acumulam (COSTERTON *et al.*, 1987). Envolvem as membranas da célula protegendo-as do dessecação e outros estresses ambientais, e devido às cápsulas de natureza iônica, podem ajudar na fixação de minerais e nutrientes próximos a célula da bactéria. (SUTHERLAND, 1988; WHITFIELD, 1988, WEINER *et al.*, 1995).

Segundo WEINER *et al.*, (1995), os fatores ambientais que podem afetar a síntese de EPS incluem oxigenação, limitação de nitrogênio e cátions (magnésio cálcio), dessecação, baixa temperatura, crescimento em meio mínimo e fase de crescimento, limitação de nutrientes.

Os heteropolissacarídeos são polímeros ácidos, compostos de arranjos lineares de repetições de unidades de açúcares neutros e ácidos urônicos, bem como os substituintes

não carboidratados, tais como acetato, piruvato e succinato (SUTHERLAND, 1988; WHITFIELD, 1988).

A biossíntese dos heteropolissacarídeos envolve 4 estágios: a) síntese do nucleotídeo ó açúcar difosfatado intermediário; b) agregação de oligossacarídeos na subunidade do polímero pela transferência de monossacarídeos do nucleotídeo correspondente ao lipídeo carregador localizado na membrana celular; c) adição de novos componentes, tais como: piruvato, acetato, succinato e sulfato e d) transferência da cadeia de polissacarídeos em crescimento, do lipídeo carregador para nova subunidade.



A síntese do EPS requer enzimas para produção de cada nucleotídeo do açúcar precursor, transferases que separam cada monossacarídeo na subunidade e proteínas envolvidas na síntese total de polissacarídeos. Muito pouco é conhecido sobre o atual mecanismo de polimerização, mas acredita-se que ocorre na membrana citoplasmática e depois o EPS é transportado para fora da célula (SUTHERLAND, 1988; TROY, 1979).

Os EPS das bactérias estabelecem um modelo importante de sistemas para o estudo da agregação e secreção molecular, regulação gênica, interações célula-célula, simbiose e patogenicidade (LEIGH & COPLIN, 1992).

Muitas bactérias fitopatogênicas produzem polissacarídeos extracelulares EPS que contribuem para sua patogenicidade nas plantas (DENNY, 1995). Estas bactérias aparecem atadas às paredes dos vasos do xilema por fios extracelulares produzidos por elas e que usualmente são mais abundantes em uma das extremidades da bactéria. Os fios assemelham-se a fibras de polissacarídeos, que constituem o EPS, aos quais, acredita-se que sejam responsáveis por aderir à bactéria em uma variedade de ambientes turbulentos, com fluxo rápido como no xilema e no cibário dos vetores.

As fibras de polissacarídeos do EPS, carregadas negativamente, devem funcionar como um substrato de troca iônica, auxiliando a captação de nutrientes pelas bactérias agregadas ou conservando e concentrando metabólitos (proteínas, toxinas, etc.) liberados pelas bactérias na ação contra o tecido do hospedeiro (MATTHYSSE, 1985). HART *et al.*, (2001), mediram a difusão de Mn^{+2} de alguns polímeros e os resultados obtidos sugerem que a presença e a natureza da carga, presente na molécula de polissacarídeo, afetam a velocidade de transporte dos cátions.

Um exemplo de exopolissacarídeo utilizado como substituto biodegradável da fibra de nylon é o pululano (Figura 5). Este exopolissacarídeo é excretado por diversos fungos presentes na natureza, não tóxicos e não patogênicos, particularmente pelo fungo *Aureobasidium pullulan*. O pululano é um α -D-glucano constituído por unidades repetidas de maltotrioses através de ligações α -1,6- glicosídicas formando uma estrutura do tipo degrau.

O pululano não possui odor nem sabor e não é tóxico. O seu peso molecular varia entre 0,8 a 2×10^6 Da dependendo das condições de cultura. É solúvel em água e geralmente insolúvel em solventes. A sua solubilidade e propriedades térmicas podem ser modificadas quimicamente, originando soluções aquosas estáveis, viscosas e sem formação de géis.

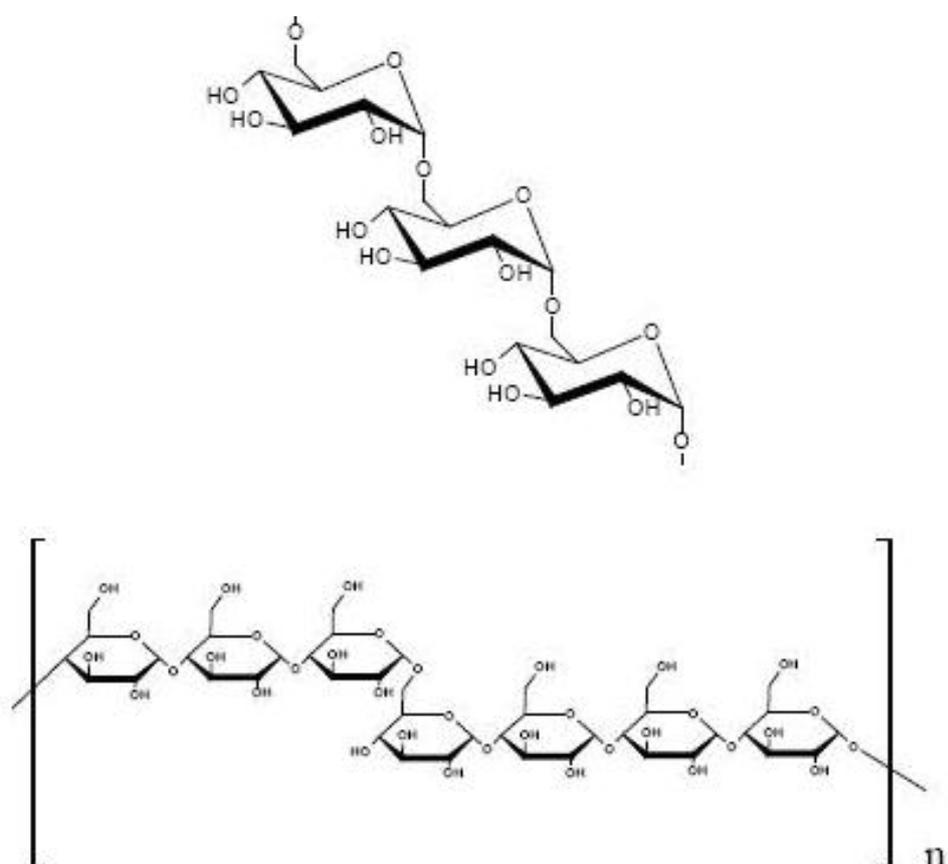


Figura 5 ó Representação estrutural do exopolissacarídeo pululano.

O pululano é produzido em biorreatores a partir do cultivo do fungo *A. pulullans* em condições mesofílicas (30° C) com agitação, arejamento e adição de hidrolisado de amido (xarope de dextrose 40-50% ou 10-15%) como fonte de carbono durante aproximadamente 100 horas. O meio ainda inclui peptona, fosfato e sais em quantidades basais. O pH inicial é de 6,5 e diminui para 3,5 após 24 horas de processo. No final da reação a cultura é sujeita a sucessivas filtrações. O filtrado é arrefecido e passa por colunas de resinas de troca iônica para remoção de cloretos, proteínas e pigmentos. O filtrado é evaporado até 12% de sólidos, encaminhado para remoção da cor e novamente filtrado. Segue uma segunda evaporação até 30% de sólidos, onde é seco, pulverizado e classificado

com o auxílio de peneiras de 1,0 mm de diâmetro. O diagrama do processo de produção de pululana encontra-se esquematizado na Figura 6.

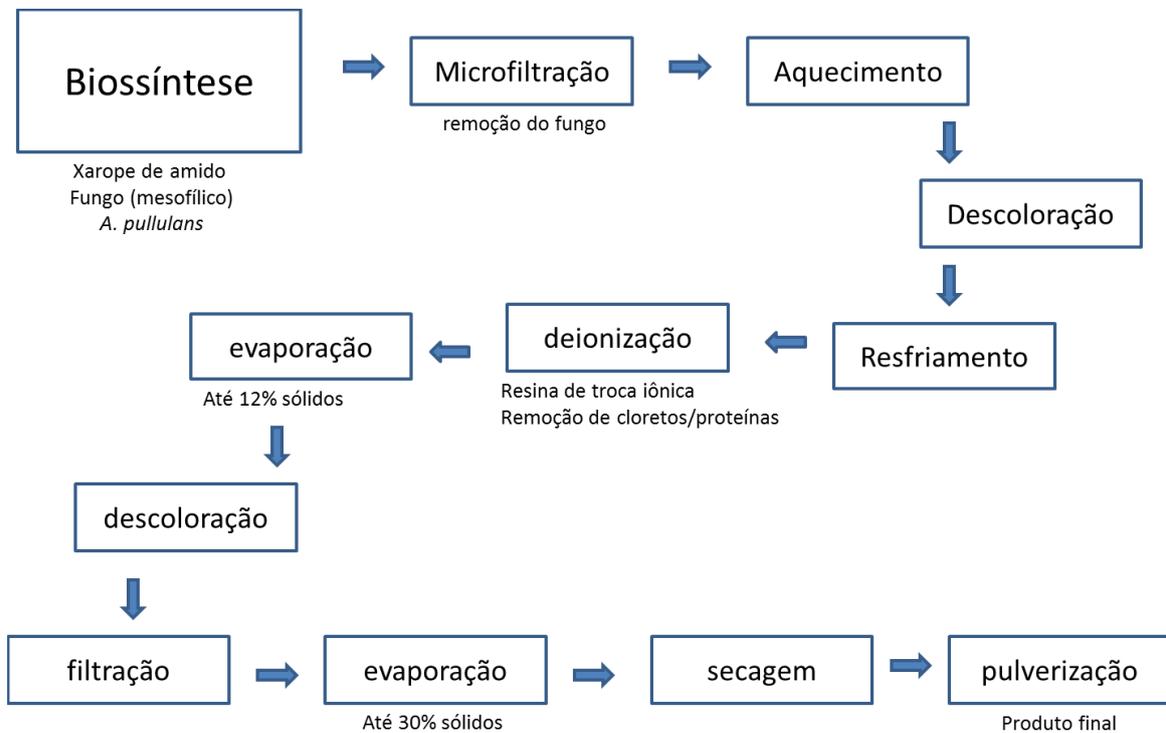


Figura 6- Esquema de produção de pululano a partir de *A. pullulans*.

Assim como outros exopolissacarídeos, o pululano apresenta várias aplicações como na indústria alimentar (revestimento externo em alimentos, fixador de ingredientes), indústria farmacêutica (moldada em cápsulas para embalar produtos farmacêuticos e suplementos alimentar; excipiente em comprimidos), indústria petrolífera, cosmética (cremes hidratantes e géis) e na indústria do plástico (substituto biodegradável da fibra de nylon, rayon, poliestireno e cloreto de polivinil).

3.4.1 Biopolímero da cana-de-açúcar (BPCA)

O BPCA é um exopolissacarídeo obtido por síntese bacteriana, *Zoogloea sp*, (Figura 7) a partir de melaço de cana-de-açúcar e apresenta características físicas e químicas adequadas para a confecção de próteses em cirurgia geral. O biopolímero foi sintetizado inicialmente na Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina, da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, a partir de 1990. O processo de produção foi otimizado, obtendo-se no presente uma taxa de conversão de 50% (CASTRO *et al.*, 2004, LIMA *et al.*, 2005).

O biopolímero *in natura*, ainda com açúcares residuais, foi inicialmente empregado no tratamento de feridas acidentais em animais domésticos, reduzindo a contaminação bacteriana e o tempo de cicatrização.

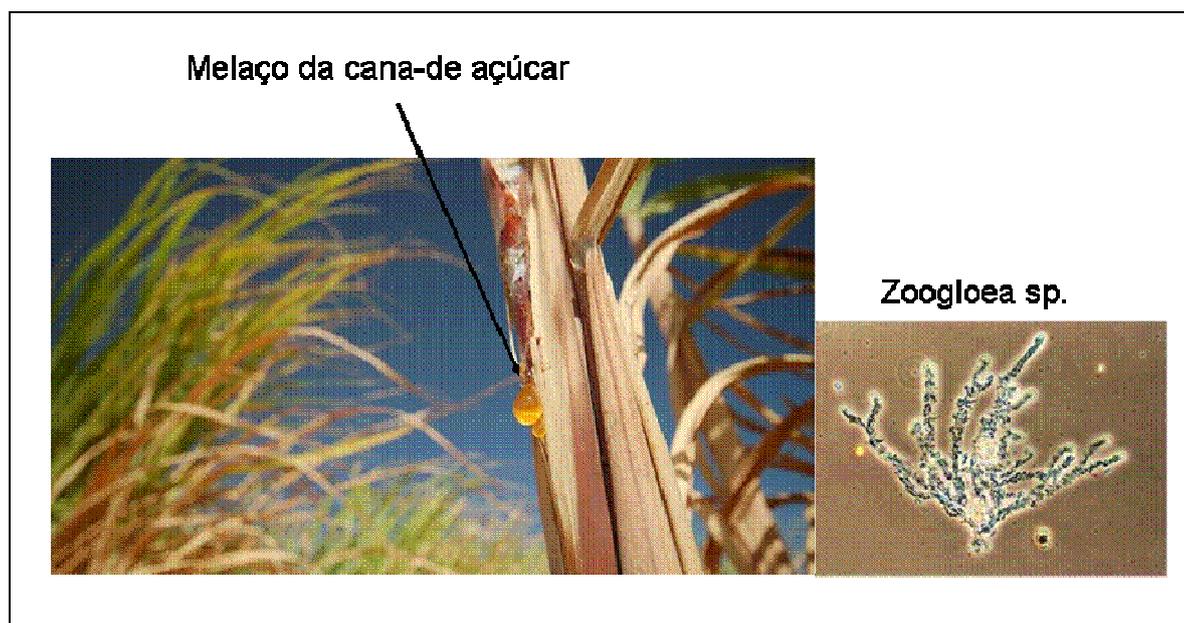


Figura 7- *Zoogloea sp.* a partir do melaço da cana-de-açúcar.

Recentemente, o grupo de pesquisa Biopolímero de cana-de-açúcar desenvolveu um processo de tratamento para redução dos açúcares residuais do biopolímero, obtendo um produto puro, constituído unicamente de açúcares e ácido glicurônico polimerizados. O

referido polímero apresenta elasticidade, resistência à tração, flexibilidade (Figura 8) e ainda pode ser modelado em diferentes formas, características físico química fundamentais para a confecção de implantes biológicos (LIMA *et al.*, 2005).



Figura 8 - Curativo a partir de melão da cana-de-açúcar.

O biopolímero da cana-de-açúcar é um exopolissacarídeo natural, sendo composto por diferentes monossacarídeos podendo-se destacar a glicose (87,6%), seguido por xilose (8,58%), ribose (1,68%), ácido glicurônico (0,83%), manose (0,82%), arabinose (0,37%), galactose (0,13%), ramnose (0,01%) e fucose (0,01%). Os polissacarídeos são sintetizados e excretados pela *Zoogloea sp.*, quando esta bactéria permanece em um meio rico em melão da cana-de-açúcar (Paterson-Beedle *et al.*, 2000).

3.4.2 Aplicações biotecnológicas do biopolímero da cana-de-açúcar

Várias aplicações têm sido demonstradas para o biopolímero da cana-de-açúcar, podendo-se destacar sua ação em curativos. O biopolímero *in natura*, com açúcares residuais, foi utilizado como curativos no tratamento de feridas acidentais em cães. Os

curativos promoveram: aumento do tecido de granulação, controle da infecção e diminuição do tempo de cicatrização (COELHO *et al.*, 2002).

O processo de interação da membrana do biopolímero da cana-de-açúcar na mucosa da orelha do rato e cavidade peritoneal revelou um tipo de reação inflamatória, o qual foi dividido em agudo, subagudo e crônico. O padrão histológico agudo caracteriza-se por exsudação de líquido e proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos, predominantemente neutrófilos. Desta forma, evidencia-se a atividade inflamatória do biopolímero por meio da sua atividade de formar aderências quando aplicado na cavidade peritoneal de ratos (LIMA *et al.*, 2005).

Em adição, estudos recentes têm demonstrado que o BPCA se apresenta como um bom candidato de implante de bexiga. O biopolímero foi um material com uma boa integração da bexiga de ratos e sua absorção foi mais lenta em comparação com a poliglactina. Foi observada uma redução na presença de cálculos urinários em bexigas com implante de BPCA, particularmente depois de 8 semanas (CARVALHO JUNIOR *et al.*, 2012).

O BPCA tem sido amplamente utilizado em vários tecidos e de muitas formas em experiências com animais como na reconstrução arterial, em prótese de membrana timpânica, em reconstrução ureteral e como matriz de culturas de células (CASTRO *et al.*, 2004, COELHO *et al.*, 2002, CHAGAS *et al.*, 2005, VILAR *et al.*, 2005, LUCENA, 2007). Além disso, o biopolímero da cana-de-açúcar também apresenta aplicação na medicina veterinária, demonstrando papel muito importante em curativos biológicos para feridas cutâneas, com ação bacteriostática e efeito bactericida (COELHO *et al.*, 2002).

Outra aplicação importante do BPCA é seu uso no tratamento de lesões críticas osteocondrais (CARNEIRO DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2011), uma vez que, os defeitos osteocondrais geralmente evoluem para doença articular degenerativa, caracterizada por

dor, rigidez e perda da mobilidade articular. Essa enfermidade está entre as causas mais comuns de dor e incapacidade entre a população de meia-idade e idosos. A cartilagem articular, por ser desprovida de vascularização, tem potencial limitado de cicatrização, fazendo com que seu tratamento continue sendo um verdadeiro desafio para os ortopedistas (HAASPER *et al.*, 2008). Desta forma, esta pesquisa revelou que o BPCA foi capaz de reparar o tecido osteocondral, sendo comprovado por exame macroscópico, característica da superfície articular, cicatrização, coloração, consistência e continuidade (CARNEIRO DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2011). Assim, devido à biocompatibilidade desse biomaterial, novos estudos com indutores de cicatrização poderão comprovar a sua eficácia como redutor do tempo de cicatrização no reparo dos defeitos da cartilagem articular.

Com base nas aplicações do biopolímero da cana-de-açúcar é que estamos propomos o uso de BPCA como suporte para crescimento de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical para futuro uso como enxerto corpóreo.

3.5. Cultivo de células tronco e engenharia de tecidos

Atualmente as células-tronco (CT) podem ser definidas como uma população de células capazes de permanecer no seu estado indiferenciado e que geram células filhas com características idênticas.

Sempre que uma célula não-tronco se divide por mitose, esta dá origem a duas células filhas semelhante, em um processo conhecido como divisão assimétrica, como ocorre também com CT, tem-se uma separação citoplasmática diferenciada gerando uma célula idêntica a original, que se expandirá clonogenicamente, em outra célula comprometida com uma linhagem específica (FUCHS e SEGRE 2000; REYA *et al.*, 2001; CHOUMERIANOU *et al.*, 2008). A divisão assimétrica ocorre também no

desenvolvimento do zigoto, espermatogênese e oogênese (RAMALHOSANTOS e WILLENBRING, 2007).

As CT são classificadas de acordo com sua origem e plasticidade, (AEJAZ *et al.*, 2007; CHOUMERIANOU *et al.*, 2008). As CT embrionárias (CTE) podem ser: totipotentes (capaz de se diferenciar em qualquer tipo de tecido, incluindo os anexos extra-embrionários) podendo ser encontradas na fase de zigoto e primeira clivagem do blastômero; ou pluripotentes (formam todos os tipos de tecidos exceto os anexos extra-embrionários), encontrada na massa interna do blastocisto, células do epiblasto (após implantação) e nas células germinativas primordiais (fase tardia embrionária/início da fetal).

As CT adultas têm seu potencial mais limitado quando comparado com a embrionária, são ditas multipotentes (originam tipos específicos de tecidos, a partir de uma determinada linhagem), temos como exemplo as CT hematopoiéticas ou ainda unipotentes (formam apenas um tipo de tecido celular) (AEJAZ *et al.*, 2007; WATT & DRISKELL 2010).

As células-tronco embrionárias têm a capacidade de se diferenciar em todos tecidos, além disso, formam derivados dos três folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma), mesmo sendo cultivados *in vitro* (THOMSON *et al.*, 1998; AEJAZ *et al.*, 2007).

Estudos em camundongos e humanos vêm sendo realizados com CTE, porém questões relacionadas à compatibilidade, segurança e ética, têm dificultado o uso destas em pesquisas e na terapia celular. Já as células-tronco adultas são menos indiferenciadas e na maioria das vezes formam tecido-específico, estas apresentam menor capacidade de rejeição (enxerto *versus* hospedeiro), porém ainda existem problemas a serem superados

com relação ao seu cultivo e expansão *in vitro*, limitando-as apenas a função de reparação e homeostase do tecido onde foram encontradas (CHOUMERIANOU *et al.*, 2008).

CT mesenquimais são multipotentes, não hematopoiéticas, capazes de se auto-renovar e diferenciar *in vitro e in vivo* em diferentes linhagens incluindo adipogênica, condrogênica, osteogênica e miogênica. Embora a principal fonte de células-tronco mesenquimais seja a medula óssea, pode-se obter este tipo celular de outros tecidos como músculo esquelético, tecido adiposo, membrana sinovial, sangue de cordão umbilical e fluídos placentários, entre outros (LA *et al.*, 2009, BENAMI *et al.*, 2011).

As CTs provenientes de cordão umbilical (CU) apresentam um forte atrativo para seu uso, quando o interesse for intervir na demanda que existe pela procura da medula óssea para o uso em terapias celulares, pois de forma parecida o CU apresenta uma fração hematopoiética e outra mesenquimal (ROCHA & GLUCKMAN 2006; BAKSH *et al.*, 2007).

Estudos relatam comparações entre células-tronco mesenquimais fetais (fCTMs) e células-tronco adultas (CTAs) quando cultivadas *in vitro*, fCTMs apresentam maior características podem ser devido ao tamanho dos telômeros, que nas fCTMs são mais longos (GUILLOT *et al.*, 2007; TROYER & WEISS, 2008). Células fetais parecem não ter propriedades de rejeição, porém estas propriedades são relatadas nas CTAs (GOTHERSTROM *et al.*, 2005).

O CU é um anexo embrionário geralmente descartado após o parto. Sua coleta é realizada de forma simples, segura e não dolorosa; não causando nenhum dano para saúde da mãe nem do recém-nascido, e visto o seu potencial como fonte alternativa de células tronco mesenquimais, células estas com incrível potencial de diferenciação e reparo tecidual seu uso apenas tende a enriquecer as pesquisas. (WEISS & TROYER 2006; CAN & KARAHUSEYINOGLU 2007; SECCO *et al.*, 2008).

3.5.1 Suportes para crescimento de células tronco

A função do *arcabouço* é proporcionar tanto uma superfície para o crescimento celular quanto suporte mecânico e estrutural do tecido original enquanto o novo tecido é formado (Barbanti *et al.*, 2005). Na regeneração tecidual, este suporte proverá o ambiente necessário para a diferenciação celular e definirá a forma final do tecido regenerado (Hokugo *et al.*, 2006). Estas estruturas provêm um suporte biomecânico inicial para o tecido implantado até que as células produzam a matriz extracelular adequada. Durante a formação, deposição e organização da nova matriz, o ideal é que o *arcabouço* degrade e seja metabolizado, deixando que o órgão vital ou tecido seja reestabelecido, mantenha ou melhore sua função tecidual (Stock e Vacanti, 2001).

As propriedades mecânicas dos *arcabouços* como a resistência à tração, flexão e compressão, ductilidade (propriedade de suportar a deformação sem romper ou fraturar) e módulo de Young (razão entre tensão e deformação no regime elástico) são determinadas tanto pelas propriedades do material quanto pela estrutura do mesmo (macro, micro e nanoestrutura). A combinação das propriedades mecânicas do *arcabouço* com o ambiente do enxerto é de crucial importância para que a progressão da recuperação tecidual não seja limitada por falhas mecânicas do *arcabouço*, e para que haja a promoção da regeneração tecidual (Muschler *et al.*, 2004).

O suporte dado pelos biomateriais, através dos *arcabouços*, pode facilitar a restauração da estrutura e função de tecidos danificados, tanto em terapias baseadas em células, como aquelas que comportam células transplantadas ou matrizes que induzem a morfogênese em tecidos bioengenheirados construídos *ex vivo*, quanto em terapias sem células, como aquelas onde há materiais indutores de migração, crescimento e diferenciação das células em tecidos sadios *in situ* (Lutolf e Hubbell, 2005).

Estes materiais devem prover um suporte tridimensional provisório para interagir biomolecularmente com as células para controlar suas funções, guiando espacialmente os processos multicelulares complexos de formação e regeneração tecidual (Lutolf e Hubbell, 2005). É importante salientar que a estrutura química do material e o seu processamento determinam as propriedades funcionais e a interação das células com o *arcabouço* (Hollister, 2005).

3.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

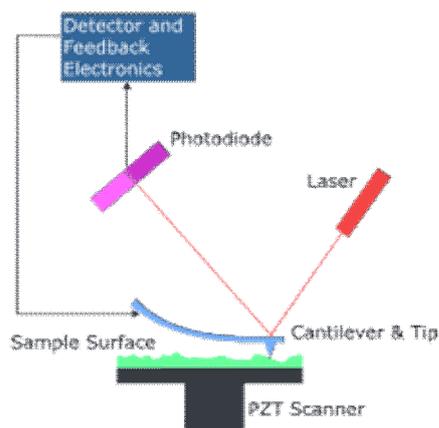
A seguir serão apresentados os princípios de alguns métodos de caracterização utilizados neste trabalho.

3.6.1 Microscopia de força atômica (AFM) e Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O microscópio de força atômica (*atomic force microscope* - AFM, o primeiro da linha do Scanning Force Microscopy (SFM), abrange aplicações simples, como o estudo das características morfológicas e estruturais da superfície dos polímeros, bem como de suas propriedades em escala nanométrica. Embora os polímeros tenham uma grande importância tecnológica, muito ainda deve ser feito para o melhor conhecimento da sua morfologia. É por isso que o aparecimento da técnica de AFM tem causado um impacto tão grande na pesquisa e desenvolvimento de compostos macromoleculares (HERRMANN *et al.*, 1997).

Enquanto os melhores microscópios eletrônicos comerciais possibilitam aumentos de no máximo algumas centenas de milhares de vezes, o AFM pode obter imagens com aumento de várias dezenas de milhões de vezes, com a vantagem de ter esta mesma resolução nas 3 dimensões, o que não ocorre com os primeiros.

Funciona com uma pequena ponta que é acoplada a uma ponteira, que está fixa a um suporte. Entre a ponta e os átomos da superfície da amostra existem interações que podem ser atrativas ou repulsivas. Em grandes distâncias, as interações são predominantemente atrativas, devido às [forças de Van der Waals](#). Se aproximarmos ainda mais a ponta com a superfície, as interações são repulsivas devido a repulsão entre os orbitais eletrônicos dos átomos da superfície da amostra e os da ponta do microscópio de força atômica. A força anula-se quando a distância entre os átomos é da ordem de alguns ângstrons (da ordem da distância característica de uma união química) (DUARTE *et al.*, 2003).



A força resultante destas interações faz com que a consola (de 100 a 200 mm de comprimento) se aproxime ou se afaste gerando deflexões. Na consola é fixado um pequeno elemento piezelétrico (modulador piezo) para conduzir o feixe de laser na sua frequência de ressonância e então conecta-se a amostra ao piezoelétrico tridimensional, o scanner x,y,z. Na parte superior a haste existe uma superfície espelhada, que reflete a luz de um feixe de laser, que em seguida passa através de uma lente e incide sobre um fotodetector (matriz de fotodiodos) cujo sinal de saída é recolhida por um amplificador diferencial, que mede as variações de posição e da intensidade da luz produzidas pelas deflexões da consola. Assim os movimentos

nanométricos podem ser detectados, gerando sinais elétricos que são armazenadas e processados por um computador e convertidos em imagem topográficas, bi ou tridimensionais da superfície do material em resolução atômica (DUARTE *et al.*, 2003).

As principais vantagens do AFM: alta resolução, imagem em 3 dimensões, não existe necessidade de recobrimento condutivo, não requer métodos específicos de preparação da amostra, permite a quantificação direta da rugosidade da amostra, permite a medida da espessura de filmes ultra-finos sobre substratos, análise por fractal, pode diferenciar fases com diferentes viscoelasticidades, permite a medida de propriedades mecânicas do material analisado em escala nanométrica, análise de amostras imersas em meio líquido e menor custo do que os microscópios eletrônicos (HERRMANN *et al.*, 1997).

Estas análises se tornam possíveis por haver uma interação do cantilever acoplado a este equipamento, com a superfície da amostra e a partir desta interação e das forças de repulsão envolvidas, visto que a distância está diretamente relacionada com as forças de repulsão, é que as imagens são formadas.

A microscopia eletrônica varredura (MEV) fornece informações da superfície de um material sendo utilizada em várias áreas de conhecimento, dentre elas a ciência de materiais. O uso dessa técnica vem se tornando mais frequente por fornecer informações de detalhes com aumentos de até 1.000.000 de vezes. O princípio de funcionamento do MEV consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 KV. Essa variação de voltagem permite a variação da aceleração dos elétrons, e também provoca o aquecimento do filamento. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai fortemente os elétrons gerados, resultando numa aceleração em direção ao eletrodo positivo. A correção do percurso dos feixes é realizada

pelas lentes condensadoras que alinham os feixes em direção à abertura da objetiva. A objetiva ajusta o foco dos feixes de elétrons antes dos elétrons atingirem a amostra analisada (DUARTE *et al.*, 2003). Uma das vantagens do MEV é a rapidez e facilidade na preparação das amostras, que depende do objetivo da pesquisa (DUARTE *et al.*, 2003).

3.8.2 Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier ó FTIR

A espectroscopia de absorção no infravermelho é uma técnica amplamente utilizada na identificação de grupos funcionais e nos estudos de conformação e estrutura de macromoléculas, através da análise dos modos vibracionais. O FTIR baseia-se na propriedade que determinadas moléculas possuem de absorver radiações eletromagnéticas na região do infravermelho, que corresponde a faixa de 0,78 a 2,5 μm do espectro eletromagnético.

O espectrômetro FTIR é composto por uma fonte de radiação infravermelha, um interferômetro, compartimento de amostra e um detector de radiação infravermelho. No espectrômetro, o feixe incidido pela fonte de radiação é dirigido a um divisor de feixe, que divide o feixe em duas partes iguais. A primeira metade dirige-se ao espelho plano fixo e a segunda ao espelho plano móvel.

Essas duas radiações são novamente dirigidas ao divisor de feixe, onde sofrem recombinação, ocorrendo interferências construtivas se as duas radiações estiverem em fase e destrutiva se as duas radiações estiverem defasadas em 180° . A radiação resultante passará pelo compartimento da amostra e focalizada no detector. O espectrômetro FTIR obtém o interferograma e, pela operação de transformada de Fourier feita pelo computador, obtém-se o espectro IR natural que é o perfil espectral versus o número de onda (MATTOS *et al.*, 2004).

3.8.3 Espectroscopia de impedância elétrica e estudo de células-tronco

A técnica fornece uma visão completa e detalhada das características elétricas da interface eletrodo/solução, e estas informações são de grande interesse na pesquisa aplicada ou básica. A EIE é uma técnica de caracterização elétrica, que permite estudar o comportamento geral de um sistema quando um número grande de processos intercorrelacionados ocorre em diferentes velocidades (GRÄTZEL, 2001).

Atualmente, a EIE é utilizada em ampla gama de estudos, abrangendo desde o transporte eletrônico em dispositivos semicondutores até o estudo de processos cinéticos elétricos e eletroquímicos das mais diferentes naturezas, ou seja, processos que ocorrem em baterias de íons lítio, células fotovoltaicas, sistemas de corrosão e/ou processos eletrocatalíticos (GRÄTZEL, 2001).

Em particular, a EIE é uma técnica excelente e já bem estabelecida para caracterização de sistemas eletroquímicos que não se alteram no tempo, pelo menos naquele necessário para que a medida seja realizada. Em outras palavras, é uma técnica de estado estacionário (CARVALHO, L.A., ANDRADE, A.R., BUENO, P.R, 2006).

A resposta da aplicação de um pequeno sinal (ac), feita em uma ampla faixa de frequências e em vários potenciais, possibilita diferenciar processos com tempos característicos distintos, que na maioria das técnicas tradicionais eletroquímicas seriam vistos como contribuições simultâneas à resposta total.

As reações na interface elétrica abrangem tópicos tais como a natureza da interface eletrodo-solução, termodinâmica e cinética de reações de eletrodo, bem como efeitos de transporte de massa. Por sua vez, as reações eletroquímicas são, em essência, reações químicas, e como regra, ocorrem de acordo com princípios químicos gerais. Há, contudo, certas características das reações eletroquímicas que são únicas. Algumas delas envolvem a

transferência de elétrons (sendo categorizadas, portanto, como reações de óxido-redução); são heterogêneas em natureza, o que implica em cinética heterogênea e, portanto, depende das dimensões, da área do eletrodo e das propriedades de interface do eletrodo; a corrente é uma medida simples da velocidade da reação; mudanças na velocidade da reação são induzidas pelo potencial e, a passagem da corrente através de uma célula eletroquímica representa a transição entre condutividade eletrônica (no eletrodo) e condutividade iônica (na solução) (CARVALHO, L.A., ANDRADE, A.R., BUENO, P.R, 2006).

É muito importante entender como a interface eletrodo/solução se comporta. A representação de uma interface eletrificada simples, isto é, quando a interface se comporta até certo ponto analogamente a uma combinação em paralelo de um resistor R_{tc} e um capacitor C_{dc} , pode ser feita por um modelo de circuito equivalente. A R_{tc} representa a relação entre corrente e potencial associada com o processo de transferência de carga, a C_{dc} representa a capacitância associada com a dupla camada elétrica, sendo ambas parâmetros dependentes do potencial (CARVALHO, L.A., ANDRADE, A.R., BUENO, P.R, 2006).

A EIE é uma técnica útil para a avaliação do estado fisiológico celular e na detecção específica de linhagens celulares diferentes por meio de biossensores eletroquímicos. Em adição, estudos recentes demonstraram a aplicação da EIE no desenvolvimento de um citosensor baseado no sistema Concanavalina A e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (ConA-MWCNT) para a detecção de células K562 com limite de detecção variando de 1×10^4 a 1×10^7 células mL^{-1} . O sistema ConA-MWCNT pôde ser ainda utilizada para o monitoramento da variação dinâmica da expressão em células K562 de glicano, em resposta a drogas (XUE *et al.*,. 2011).

3.9 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AHMED, J.; VARSHNEY, S. K. Polylactides ó Chemistry, properties and green packaging technology: a review. *Int. J. Food Properties*, 14, 37-58, 2010.

AMBROSE, C.G., CLANTON, T. O. Bioabsorbable implants: review of clinical experience in orthopedic surgery. *Ann. Biomed. Eng.*, 32, 171-177, 2004.

AURAS, R., HARTE, B., SELKE, S. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromol. Biosci.*, 4, 835-864, 2004.

BARBANTI, S.H., ZAVALGIA, C.A.C., DUEK, E.A.R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 15, 13-21, 2005.

BLUNK, T., GÖPFERICH, A., TESSMAR, J. Special issue Biomimetic Polymers. *Biomaterials*, 24, 4335, 2003.

CAIA, K., RECHTENBACH, A., HAOA, J. Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: Characterization and cell behavior aspects. *Biomaterials*, 26, 596065971, 2005.

CARNEIRO DE ALBUQUERQUE, P.C.V., SANTOS, S.M., AGUIAR, J.L.A., Filho, N.P., Mello, R.J.V., COSTA, M.L.R., OLBERTZ, C.M.C.A., ALMEIDA, T.M.S., SANTOS, A.H.S., SILVA, J.C. Comparative macroscopic study of osteochondral defects produced in femurs of rabbits repaired with biopolymer gel cane sugar. *Rev. Bras. Ortop.* 46, 577-84, 2011.

CARVALHO JUNIOR, A.M., SANTOS, M.M., BARKOKÉBAS, B.B., AGUIAR, J.L.A., LIMA, S.V.C., DAMBROS, M. Characterization of the Deposition of Collagen Fibers and

Lithogenic Potential in Bladder of Rats Submitted to a Sugar Cane Biopolymer Graft. Int. Braz. J. Urol., 38, 544-551, 2012.

CASTRO, C.M, AGUIAR, J.L, MELO, F.A., SILVA, W.T, MARQUES, E., SILVA, D.B. Citotoxicidade do biopolímero de cana-de-açúcar. Na Fac Med Univ Fed Pernamb. 49, 119-23, 2004.

CAVALCANTE, A.H.M., CARVALHO JUNIOR,L.B., CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. Cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. as a film support for trypsin immobilisation. Biochemical Engineering Journal. 29, 2586261, 2006.

CHAGAS, H.M, AGUIAR, J.L.A, ANDRADE, R.T, MONTORO, M., VILAR, F.O., LIMA, S.V.C. Uso da membrana de biopolímero de cana-de-açúcar na reconstrução ureteral. International Braz. J. Urol. 30, 43, 2005.

COELHO, M.C, CARRAZONI, P.G., MONTEIRO, V.L., MELO, F.A., MOTA, R.A., TENÓRIO FILHO, F. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. Acta Cir. Bras., 17, 11-3, 2002.

COSTERTON, J.W., CHENG, K.J., GEESEY, G.G., LADD, T.I., NICKEL, J.C., DASGUPTA, M., MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. Ann. Rev. Microbiol. 41, 435-464, 1987.

CRUZ, A. S. Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entrem em contato com o ser humano. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 47, 51-57, 1987.

DENNY, T.P. Testing pathogenicity. In: WILLIAMS, P., KETLEY, J., SALMOND, G. Bacterial pathogenesis: methods in microbiology. London: Academic Press, 27, 129-137, 1995.

DRUMOND, W.S., WANG, S.H., MOTHÉ, C.G. Síntese e caracterização do copolímero poli (ácido láctico-B-glicol etilênico). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 14, 74-79, 2004.

GONÇALVES, N.A. Síntese e caracterização de nanocompósitos compostos por poli (l-lactídeo) e hidróxido duplo lamelar / Núria Ângelo Gonçalves. --Campinas, SP: [s.n.], 2012.

GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials, *Acta Materials*, v.48, p.263-277, 2000 .

HAASPER, C., ZELLE B.A, KNOBLOCH, K. No mid-term difference in mosaicplasty in previously treated versus previously untreated patients with osteochondral lesions of the talus. *Arch. Orthop. Trauma Surg.*128, 499-504, 2008.

HART, T.D., HILL, R.J., GLOVER, P.M., LYNCH, J.M., CHAMBERLAIN, A.H.L. Effect of a range of microbial polysaccharides on the diffusion of manganese ions using spatially resolved NMR relaxometry. *Enzyme and Microbial Technol.*, 28, 370-375, 2001.

HELMUS, M.N., TWEDEN; K., 1995. "Materials selection" in *Encyclopedia Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, v 2,1429-1463, 1995.

HONG, S,G., CHEN, W.M. The attenuated total reflection infrared analysis of surface crystallinity of polyhydroxyalkanoates. *E-Polymers*, 24, 1-17, 2006.

HUTMACHER, D.W., "Arcabouços in tissue engineering bone and cartilage", *Biomaterials*, v. 21, 2529-2543, 2000.

JAHNO, V.D. Síntese e caracterização do poli (L-ácido láctico) para uso como biomaterial. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2005.

JAMSHIDIAN, M., TEHRANY, E.A., IMRAN, M., JACQUOT, M., DESOBRY, S. Poly - lactic acid: production, applications, nanocomposites and release studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 552-571, 2010.

KELLOMAKI, M., TORMALA, P. Processing of Resorbable Poly- -Hydroxy Acids for Use as Tissue-Engineering Arcabouços. *Method. Mol. Biol.*, 238, 1-10, 2004.

KOYAMA, N., DOI, Y. Morphology and Biodegradability of a Binary Blend of Poly((R)-3-Hydroxybutiric Acid) and Poly((R,S)-Lactic Acid). *Canadian Journal Microbiology*. 41, 316-322, 1995.

KOYAMA, N., DOI, Y. Miscibility of a Binary Blends of Poly((R)-3-Hydroxybutiric Acid) and Poly((S)-Lactic Acid). *Polymer*. 38, 1589, 1997.

KULKARNI, R.K., PANI, K.C., LEUMAN, C., LEONARD, F. Polylactic acid for surgical implants. *Arch. Surg.* 93, 839, 1966.

LEIGH, J.A., COPLIN, D.L. Exopolysacharides in plant-bacterial interactions. *Ann. Rev. Microbiol.*, 46, 307-346, 1992.

LIMA FR, LIMA JRA, HIRAKAWA P, MEDEIROS JÚNIOR DM, LIMA FMT, AGUIAR JLA. Resposta inflamatória à membranas de biopolímero de cana-de-açúcar e telas de polipropileno® implantadas no peritônio parietal de ratos. *An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb. Recife*, 50, 37-40, 2005.

LIU, T.V., BHATIA S.N. Three-dimensional tissue fabrication. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 56, 1635, 2004.

LORCAN, T.A., TOSETTO, M.; MILLER, I.A., O'CONNOR, D.P., PENNEY, S.C., LYNCH, I., KEENAN, A.K., PENNINGTON, S.R., DAWSON, K.A. & GALLAGHER W.M. Surface-induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interactions. *Biomaterials*, 27, 309663108, 2006.

LUCENA RG. Utilização do biopolímero de cana-de-açúcar como novo material para sling pubo vaginal: Análise estereológica [Tese Doutorado] Recife-PE. Universidade Federal de Pernambuco. 2007.

MATTHYSSE, A.G. Mechanisms of bacterial adhesion to plant surfaces. In: SAVAGE, D.C., FLETCHER, M. (eds). Bacterial adhesion: mechanisms and physiological significance. New York: Plenum Press.1, 255-278, 1985.

MAQUET, V., BOCCACCINI, A.R., PRAVATA, L., NOTINGHER, I., JEROME, R. Porous poly(alpha-hydroxyacid)/Bioglass (R) composite arcabouços for bone tissue engineering. I: preparation and in vitro characterization. Biomaterials, 25, 4185-4194, 2004.

METZKE, M., O'CONNOR, N., MAITI, S., NELSON, E., GUAN, Z. Saccharide-Peptide Hybrid Copolymers as Biomaterials. Biomaterials, 44, 6529-6533, 2005.

MEYER, A.A., SCHRODER, K., FINKE B., OHL, A. 2003. Current trends in biomaterial surface functionalization - nitrogen-containing plasma assisted processes with enhanced selectivity. Symposium on Plasma Surface Engineering, Regensburg, Alemanha, 71, 391-406, 2003.

MOTTA, A.C., DUEK, E.A.R. Síntese, caracterização e degradação *in vitro* do poli(L-ácido láctico). Polímeros: Ciência e Tecnologia, 16, 26-32, 2006.

PATERSON-BEEDLE, M., KNENEDY, J.F., MELO, F.A., LLOYD, L.L., MEDEIROS V. A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. Carbohydrate Polymers. 42, 375-83, 2000.

PETER, X., JENNIFER, M.A., ELISSEEFF, H. Arcabouçoing In Tissue Engineering BioMedical Engineering OnLine, 104161045, 2006.

SHIN, H. Fabrication methods of an engineered microenvironment for analysis of cell-biomaterial interactions, Biomaterials 28, 1266-133, 2007.

SINGH, V.M., KOO, D., PALMESE, G.R., CAIRNCROSS, R.A. Synthesis of polylactide with varying molecular weight and aliphatic content: effect on moisture sorption. *J. Appl. Pol. Sci.*, 120, 254362549, 2010.

SUTHERLAND, I.W. Bacterial surface polysaccharides: structure and function. *International Review of Cytology*, 113, 187-231, 1988.

TOKIWA, Y., CALABAIA, B.P., UGWU, C.U., AIBA, S. Biodegradability of plastics. *Int. J. Mol. Sci.*, 10, 3722-3742, 2009.

TROY, F.A. The chemistry and biosynthesis of selected bacterial capsular polymers. *Ann. Rev. Microbiol.*, 33, 519-560, 1979.

VALIMAA, T., LAAKSOVIRTA, S. Degradation behaviour of self-reinforced 80L/20G PLGA devices in vitro. *Biomaterials*, 25, 1225-1232, 2004.

VERT, M., LI, M.S., SPENLEHAUER, G., GUERIN, P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J. Mater. Sci.*, 3, 432, 1992.

VILAR, F.O., VASCONCELOS, G.B., LIMA, R.F., LIMA, S.V., AGUIAR, J.L. Um novo material para tratamento da incontinência urinária: Estudo em ratas. *Acta Cir Bras.* 20, 13-19, 2005.

WEINER, R., LANGILLE, S., QUINTERO, E. Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. *J. Ind. Microbiol.*, 15, 339-346, 1995.

WILLIAMS, E.C., JANMEY, P.A., FERRY, J.D., MOSHER, D.F. Conformational states of fibronectin: effects of pH, ionic strength and collagen binding. *J. Biol. Chem.*, 257, 14973-14978, 1982.

WHITFIELD, C. Bacterial extracellular polysaccharides. *Canadian Journal Microbiology* 34, 415-420, 1988.

ZHAO, K., DENG, Y., CHEN, J.C., CHEN,G.Q. Polyhydroxyalkanoate (PHA) arcabouços with good mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials* 24, 10416-1045, 2003.

PARK, J.S., CHOI, S.H., MOON, I.S., CHO, K.S., CHAI, J.K., KIM, C.K. Eight-week histological analysis on the effect of chitosan on surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs. *J Clin Periodontol.* 30, 443-53, 2003.

KAFETZOULOS, D., MARTINOV, A., BOURIOTIS, V. *Chitin Enzymology*; Muzzarelli, R. A. A., ed., European Chitin Soc: Ancona, 147, 1993.

KUBOTA, N., TASTUMOTO, N., SANO, T., TOYA, K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydr.Res.*, 324, 268-274, 2000.

MUZZARELLI, R.A., ROCCHETTI, R. The determination of molybdenum in sea water by hot graphite atomic absorption spectrometry after concentration on p-aminobenzylcellulose or chitosan. *Anal. Chim. Acta.* 64, 371-379, 1973.

RAVI KUMAR, N.M.V. A review of chitin and chitosan applications. *Reac. Funct. Polym.* 46, 1-27, 2000.

ALVES, N.M., MANO, J.F. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 43, 4016-414, 2008.

JIANG, X., CHEN, L., ZHONG,W. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers* 54, 4576-463, 2003.

COELHO, M.C.O.C., CARRAZONI, P.G., MONTEIRO, V.L.C., MELO, F.A.D., MOTA, R., TENÓRIO FILHO F. Biopolímero produzido a partir de cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. *Acta Cirur. Bras.* 17, 1-7, 2002.

LIMA, F.R., JOSÉ RICARDO ALVES LIMA, J.R.A., HIRAKAWA¹, P., JÚNIOR, M.D.M LIMA, F.M.T., AGUIAR, J.L.A. Resposta inflamatória a membranas de biopolímero de cana-de-açúcar e telas de polipropileno® implantadas no peritônio parietal de ratos. *An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb., Recife*, 50, 37, 2005

AZEVEDO, V.V.C., CHAVES, S.A., BEZERRA, D.C., LIA FOOK, M.V., COSTA, A.C.F.M. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos* 2, 27-34, 2007.

SANTOS, J.E., SOARES, J.P., DOCKAL, E.R., CAMPANA FILHO, S.P., CAVALHEIRO, E.T.G. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 13, 242, 2003.

UENO, H., MURAKAMI, M., OKUMURA, M., KADOSAWA, T., UEDE, T., FUJINAGA, T. Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. *Biomaterials*, 22, 1667-73, 2001.

MUZZARELLI, C., MUZZARELLI, R.A. Natural and artificial chitosan-inorganic composites. *J. Inorg. Biochem.* 92, 89-94, 2002.

SPIN-NETO, R., PAVONE, C., FREITAS, R.M., MARCANTONIO, R.A.C., MARCANTONIO-JR, E. Chitosan based biomaterials with medical and dental application: literature review. *Rev. Odontol. UNESP.* 37, 155-161, 2008.

MATTOS, E.C., DUTRA, R.C.L., DINIZ, M.F., IAH, K. Técnicas FT-IR para caracterização de cobertura polimérica de material energético. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 14, 63-68, 2004.

RAMALHO-SANTOS, M., WILLENBRING, H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell*, 1, 35-38, 2007.

RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine* (Eds.), Elsevier, London, England, 2012.

FUCHS, E., SEGRE, J.A. Stem cells: a new lease on life. *Cell*, 100, 143-155, 2000.

AEJAZ, H.M. Stem cell therapy-present status. *Transplant.Proc.*, 39, 694-699, 2007.

WATT, F. M., DRISKELL, R.R. The therapeutic potential of stem cells. *Philos.Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 365, 155-163, 2010.

THOMSON, J.A. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-1147, 1998.

LA, R.G. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem.Cell Biol.*, 131, 267-282, 2009

ZOTARELLI, I.J.F., FALLEIROS, L.R.J., TABOGA, S.R., BELLINI, M.F., GRECO, O.T., VERA, A.O . TIERA, M.J.T. Synthesis And Characterization Of Chitosan Arcabouços For Pre-Clinical Tests Of Tissue Bioengineerin. <http://revistapesquisa.fapesp.br/> 2011, acesso em 13/ 12 /2012.

JIANKANG H; DICHEN L; YAXIONG L; BO Y; HANXIANG Z; QIN L; BINGHENG L; YI LV. Preparation of chitosan-gelatin hybrid arcabouços with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering. 5, 453-461, 2009.

BREYNER NM; HELL RC, CARVALHO LR, MACHADO CB, PEIXOTO FILHO IN; VALERIO P; PEREIRA MM, GOES, A, M Effect of three dimensional chitosan porous arcabouço on the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes. CTO,191, 119-28, 2010.

GAO X; LIU W; HAN B; WEI X. Preparation and cytocompatibility of chitosan based carriers of corneal cells. Sheng Wu Gong Cheng Xu Bao 8, 1361-1381 (2008).

MACHADO CB; VENTURA JM; LEMOS AF; FERREIRA JM; LEITE MF, GOES AM. 3D chitosangelatin-chondroitin porous arcabouço improve osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Biomed Mater 2, 124-31, (2007).

YANG KC; WU CC; LIN FH; QI Z; KUO TF; CHENG YH; CHEN MP; SUMI S. Chitosan/gelatin hydrogel as immunoisulative matrix for injectable bioartificial pancreas. Xenotransplantation. 6: 407-16, (2008).

SANTOS J.R., A.R., WADA, M.L.F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidua. Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 17, nº 4, p. 308-317, 2007.

BARBANTI, S.H., ZAVAGLIA, C.A.C., DUEK, E.A.R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. Polímeros: Ciência e Tecnologia, 15, 13-21. 2005.

HOKUGO, A., TAKAMOTO, T., TABATA, Y. Preparation of hybrid arcabouço from fibrin and biodegradable polymer fiber. Biomaterials, 27, 61-67, 2006.

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

MUSCHLER, G.F., NAKAMOTO, C., GRIFFITH, L.G. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. J Bone Joint Surg Am, 86, 1541-1558, 2004.

LUTOLF, M.P., HUBBELL, J.A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat. Biotechnol.*, 23, 47-55, 2005.

HOLLISTER, S.J. Porous arcabouço design for tissue engineering. *Nature Materials*, 4, 518-524, 2005.

CAPÍTULO IV

ADHESION OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM HUMAN UMBILICAL
CORD ON A NEW SUGARCANE BIOPOLYMER: A DIELECTRIC STUDY

Fragoso, A.S.¹, Silva, M.B.², de Melo, C.P.³, Aguiar, J.L.A.⁴, Rodrigues, C.G.²,
de Medeiros, P.L.⁵, Branco Junior, J.F.², Andrade, C.A.S.⁶, Oliveira, M.D.L.^{1,6*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco,
50670-901 Recife, PE, Brazil;

²Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901
Recife, PE, Brazil;

³Departamento de Física, Universidade Federal Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

⁴Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife,
PE, Brazil;

⁵Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901
Recife, PE, Brazil;

⁶Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE,
Brazil.

*Corresponding author: Phone/Fax: +55-81-2126.8540; e-mail: m_danielly@yahoo.com.br

Abstract

In this work, we have examined how the structural and dielectric properties of a sugarcane biopolymer (SCB) film are affected by the adhesion of mesenchymal stem cells (MSC), which lately have been extensively used as a potential source of cells for tissue engineering. The results of electric impedance spectroscopy (EIS) of the SCB films showed that they must prevent the passage of electrons between the solution and the metal electrode. However, the R_{et} average value of the SCB-MSC system was even higher than that of SCB without cells on their surface, which reflected an increased blockage to the passage of electrons. Indeed, a shift of the phase angle to higher frequencies was obtained for SCB-MSC system as a result from MSC adhesion. The phase angle (θ) is one of the parameters resulting from the disturbing sine wave generated by the system. When the value of θ approaches 90° indicates that the material accumulates charges by not allowing their diffusion in solution. Our study demonstrates that SCB is an excellent biocompatible matrix for growing mesenchymal stem cells, being a promising biomaterial for tissue engineering.

Keywords: biopolymer; polysaccharide; impedance spectroscopy; stem cells.

1. Introduction

Desirable properties for polymers useful for tissue engineering applications include conductivity, reversible oxidation, redox stability, biocompatibility, hydrophobicity, three dimensional geometry and surface topography (Guimard, Gomez & Schmidt, 2007). Sugarcane biopolymer (SCB) is a polysaccharide with high elasticity, resistance to traction and good mechanical flexibility. SCB is obtained from a reduced process treatment of residual sugars, composed by polymerized sugars and glicuronic acid (Coelho, Carrazoni, Monteiro, Melo, Mota & Tenório, 2002). It is worthy to note that SCB is an convenient matrix to biological implants and tissue engineering (Carvalho Junior, Santos, Barkokébas, Aguiar, Lima & Dambros, 2012). In addition, SCB can be used as arterial prosthesis, in reconstruction of timpanic membrane, urethral reconstruction and as a graft in rat bladders with good integration (Carvalho Junior, Santos, Barkokébas, Aguiar, Lima & Dambros, 2012). Recently, SCB has also been used to repair osteochondral defects in femurs of rabbits and it is shown to be involved in the reduction of healing time by significantly enhancing the proliferation of osteochondral cells (Albuquerque et al., 2011).

Chitosan (Chi) stands out among the biopolymers most used as biomaterial for cell growth (Chung, Limpanichpakdee, Yang & Tyan, 2011; Chung, Wang, Wang, Hsieh & Fu, 2008). The association of silk fibroin with Chi has been used to enhance the differentiation of rat mesenchymal stem cells (Yang et al., 2009) to a cardiomyogenic patch. Other studies revealed that blending silk, Chi and hyaluronic acid stimulate the stem cells differentiation to cardiomyocytes (Yang et al., 2010), with potential use for regenerating cardiac tissues.

Currently, electrical impedance spectroscopy (EIS) is one of the most powerful tools to evaluate interfacial phenomena and biomolecules interactions. As a sensitive and

effective method to probe the interfacial properties of modified electrodes, this technique has found widespread applications in various fields (Houa et al., 2006; Navrátilová & Skládal, 2004). EIS can provide physiological and morphological information by measuring the frequency dependence of the electrical properties of living cells and tissues (Malmivuo & Plonsey, 1995; Schwan, 1993) and it has been also employed to assess the metabolism of living cells *in vitro* (Reininger-Mack, Thielecke & Robitzki, 2002). Furthermore, EIS can be widely used for monitoring neural cell behavior on electroactive polymers for tissue repair strategies (Castro, Pólo, Labrado, Cañete & Rama, 2010) and analysis of dynamic monitoring of cell-surface glycan expression to evaluate structural variations in cellular physiology (Xue, Bao, Xiao, Ding, Lei & Ju, 2011).

Mesenchymal stem cells (MSC) have been extensively studied since they are a potential source of cells for therapeutic strategies as tissue engineering (Baksh, Song & Tuan, 2004; Chen, Rousche & Tuan, 2006). In addition, MSC is capable to regenerate and differentiate into several functional cells, such as muscle and adipose cells (Baksh, Song & Tuan, 2004; Chen, Rousche & Tuan, 2006). Also, MSC is used with success in medicine when evaluating animal models for regeneration of bone, cardiomyocytes and neurons (Chamberlain et al., 2004; Grinnemo et al., 2004; Muzzarelli, 2011).

To the best of our knowledge, the present study is the first reported dielectric investigation on the SCB-MSC interaction. In this study, we developed a homemade cell containing two small (5 mL) wells separated by a teflon barrier connected through a tight orifice (diameter $\phi = 1$ mm) where the SCB and MSC were placed to evaluate their interaction (Fig. 1). The main objective of the present work is the characterization and investigation of early responses of MSC to SCB polymer surface under serum-free conditions by using EIS, atomic force microscopy (AFM) and attenuated total reflectance

Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR). The EIS was utilized to quantify the electron transfer resistance (R_{et}) of the SCB at different thickness and potentials, before and after adhesion of MSC on the SCB surface. The impedance values of adhered MSC on the aforementioned surfaces were measured and calculated. As a result, we have been able to establish that the process of adhesion of MSC to biopolymer surfaces can be determined via EIS technique.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Pluronic F-68, minimum essential medium (MEM), alpha medium (1x), and fetal bovine serum (FBS) were all purchased from INVITROGEN (USA). All chemicals and solvents were of analytical-grade and used as received, without further purification. High-purity water was obtained after a Milli-Q plus (Billerica, USA) treatment.

2.2. SCB obtention

SCB was obtained from the bacteria *Zoogloea* sp. using medium containing glucose, yeast extract, peptone and agar in according to Carvalho Junior et al. (Carvalho Junior, Santos, Barkokébas, Aguiar, Lima & Dambros, 2012). Raw material consisted of sugar cane molasses adjusted to a 15% brix (pH=5.0). The culture is inoculated in erlenmeyers at 30 °C for up to 7 days. The produced material dried in incubator with air circulation and sterilized in autoclave at 120 °C.

2.3. Infrared spectroscopy measurements

Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) of SCB layer was determined by using a Bruker FTIR spectrometer (Bruker Optics Inc., USA) equipped with an ATR Mirade Diamond/KRSS that allowed us to record spectra between 4000 and 700 cm^{-1} . Resolution was fixed at 4 cm^{-1} and 60 scans were realized to acquire each spectrum.

2.4. Morphological analysis

Atomic force microscopy (AFM) measurements were performed with a commercial Witex microscope (Molecular Imaging, USA). Cantilevers with a Cr-Au tip (NSC18, MikroMasch, $F_0 = 90$ KHz, nominal spring constant = 5.5 N.m^{-1}) were used for the tapping mode AFM (Luna, Falcao, Melo & Andrade, 2011) in contact mode. AFM experiments were performed in air at room temperature (approximately 25°C). The areas of the samples were scanned varying from 5 $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ with a resolution of 512 \times 512 pixels. AFM images were obtained from at least two macroscopically separated areas on each sample, to eliminate artifacts. Cell adhesion and morphology were evaluated with a scanning electron microscopy (SEM) (JSM 5900, JEOL Instruments, Japan) at an acceleration voltage of 5 kV and a working distance of 5 μm , it was not necessary to carry out buffering.

2.5. Cell culture on SCB surface

SCB film was sterilized with a solution of ethanol:water (7:1, v/v) and then exposed to ultraviolet light. Subsequently, approximately 4×10^6 cells mL^{-1} (MSC) were seeded in serum-free medium and was added to the SCB surface and incubated at 37 °C in 5% CO_2 for 12 h (Chung, 2011) to investigating the adhesion of the cells. After 24 h of incubation, the cells were detached from the substrate and mixed with trypan blue/serum-free Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) solution (1:10). Viable cells were counted

using a common hemocytometer. After the incubation, the MSC-modified SCB film was washed with phosphate buffer saline and then placed in the homemade cell (Fig. 1). After that, a stainless steel electrode was immersed in water solution and then EIS was used to collect real Z' values as a function of time to assess the adhesion process of MSC on the SCB surface. Since the impedance is an imaginary number, its representation can be made with the use of Cartesian coordinates (Nyquist diagram) where the axis of abscissa is plotted the real component and the imaginary component axis of ordinate

2.6. AC impedance recording and analysis

AC electrical impedance was used to probe changes in the electrical behavior of the cells pursuant the induced differentiation. We used a homemade cell and stainless steel as electrodes (Fig. 1). Data acquisition of the dielectric response was performed using a SI 1260 gain/phase impedance analyzer (Solartron Instruments, UK) for determining the real (Z') and imaginary (Z'') parts of the impedance. The electrical impedance spectra were recorded in the 10^2 Hz to 10^5 Hz frequency range. The amplitude of applied wave potential was 10 mV and the potential applied varied from 0.2 to 1.0 V. All measurements were performed in triplicate using at least three different samples.

3. Results and Discussion

3.1. Infrared spectroscopy analysis

In order to check the chemical nature of the carbohydrate polymer films, we collected the ATR-FTIR spectra from the SCB films. These spectra allowed us to identify the presence of the main SCB characteristic vibration bands. The ATR-FTIR spectrum (Fig. 2) shows the structure of a polysaccharide with the typical band between 1200 and

900 cm^{-1} attributed to the carbohydrate C-O-C bond that confirms the presence of links between the carbohydrate units forming the biopolymer. We also observed the OH stretching band between 3600 and 3000 cm^{-1} , revealing structures of monosaccharide with the angular deformation of the connection appearing in 1639 cm^{-1} . The asymmetric stretching of the CH_2 groups is observed from 2900 to 2950 cm^{-1} (Silverstein, Webster & Kiemle, 2006).

3.2. *Optical characterization*

We performed an AFM analysis to elucidate the variation of the topography and the morphology of the studied biopolymer. Representative image of a $5 \times 5 \text{ }\mu\text{m}$ area of the SCB is shown in Fig. 3a. The AFM 3D topographical view (Fig. 3a) showed that SCB consists of a large number of quite evenly distributed hill-valley-structure surfaces, with some regular pores in the nanoscale topography. In Figs. 3b and 3c we show the 2D height and profiles images, respectively. The analysis of Fig. 3b-c can provide quantitative information from the polysaccharide surface and the diameter of the aggregates based on the vertical and horizontal distances on the surface, respectively. The section analysis can be performed by drawing a cross-sectional line over the image. One can note that the SCB films showed an irregular morphology with very characteristic features, such as fibers and a granular morphology that differ in height by approximately 190 nm.

The morphology of MSC on SCB surface was assessed using a SEM to evaluate the shape and adherence of the cell. SEM micrographs of MSC on SCB surface is illustrated in Fig. 4. As previously discussed, SCB consists of a large number of quite evenly distributed hill-valley-structure surfaces and the MSC adhered to the surface of the SCB (Fig. 4a), revealing satisfactory cell adhesion and undifferentiated cells characteristics, so were seen

around 10^6 cells adhered and presenting fairly rounded shape (Fig. 4b). Tissue-derived cells are anchorage dependent and must adhere to a solid surface to grow, proliferate and precede to further events including cell migration and differentiation (Lanza, Langer & Vacanti, 2007).

3.3. Dielectric evaluation of the SCB film and as scaffold to culture cells

EIS has been shown as a powerful tool to evaluate the dielectric response of cell adhesion on the polymer surfaces (Sarró et al., 2012). During the experiments, we have used about 10^6 cells mL^{-1} *in vitro* differentiated by incubation with growth factor. AC impedance was recorded at 10^2 Hz to 10^5 Hz with potential applied between 0.2 to 1.0 V.

The measurements were carried out by using EIS to evaluate the influence of cell penetration into the polymer matrix. Therefore, SCB films of different thicknesses were used as follows: SCB1 (19 μm), SCB2 (23 μm) and SCB3 (31 μm), the thickness measurements were carried out using digital thickness gauge. In addition, the EIS spectra were evaluated under different potentials range at 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 V to each SCB film (Fig. 5). As expected, the film SCB1 presented lower R_{et} values at different potentials as compared to the values obtained for SCB2 and SCB3, confirming that the electron transfer blockage depends of the thickness of the biopolymer films.

Figure 5 shows the Faradaic impedance spectra before and after the polysaccharide surface modification with mesenchymal stem cell incubation. The cell adhesion resulted in a significant increase of the electron transfer resistance. Accordingly, R_{et} values at the stem cells-modified SCB surfaces were higher by about 98.08 $\text{M}\Omega$ as compared to the pure SCB film. After introducing the MSC on the SCB surface, the values of R_{et} increased from 24.0 $\text{M}\Omega$ to 98.08 $\text{M}\Omega$, in an indication that the cells firmly adhere to the biopolymer surface.

Thus, the adhesion of MSC lead to the decrease of active surface area and the barrier effect against the electron transfer between the biofilm and the electrode surface. The changes in the impedance response of the SCB film were attributed to the attachment of the stem cells to the polymer network present in the SCB layer.

The Bode plots of the SCB and SCB-MSC biosystems are given in Fig. 6. As can easily note, the Bode plot for both types of systems show differences in the magnitude of the impedance at high frequency ranges; namely, the impedance magnitude of MSC at high frequency was higher than in the absence of MSC. Also, there is a clear distinction between the impedimetric responses of the SCB films of different thickness, while only small changes can be noticed in the impedance values at high frequencies (Fig. 6). The SCB3 showed an increase in the impedimetric response (Fig. 6c) that can be explained by the blockage to the displacement of ions arises near of the surface (Gheorghe & Guiseppi-Elie, 2003).

The typical electrical interface associated to the use of SCB films as support to culture cells can be represented as the electrical circuit shown in Fig. 7a. The proposed equivalent circuit includes not only the ohmic resistance of the electrolyte solution (R_s) and the Warburg impedance (W) that represents both the bulk properties of the electrolyte solution and the diffusion features of the redox probe in solution, but also the double-layer capacitance (C_{dl}) and the electron transfer resistance (R_{et}) related to the interfacial properties of the surface. Usually, R_{et} controls the interfacial electron-transfer rate between the solution and the electrode (Randles, 1947). In addition, R_{et} is equal to the semicircle diameter at higher frequencies. The impedance data were fitted to a Randles equivalent circuit by use of a Boukamp non-linear least square fitting program (Boukamp, 1986) (Fig. 7a). Our results demonstrate that the changes in R_s and R_{et} were much larger than those in

other impedance parameters. Thus, R_{et} appears as a suitable signal for sensing the interfacial properties of the SCB as a scaffold during the cell adhesion procedure.

Table 1. shows the equivalent circuit parameters of the fitting curves (Fig. 7b) for the various steps of the monitoring MSC adhesion. Generalized observations of EIS spectra during consecutive modification processes of the biopolymer associated to the formation of SCB-MSC systems show that, after MSC adhesion, the values of R_{et} of equivalent circuit increase significantly, while Cdl is reduced. The EIS spectra showed the highest R_{et} at 0.6 V. This behavior illustrates that during the contact was possible establish specific interactions between MSC and SCB demonstrating cell biocompatibility. As shown in Table 1, the resistance charge transfer magnitude was higher when stem cells were present ($\sim 82.40 \text{ Má}$) than in the pure SCB case ($\sim 23.99 \text{ Má}$).

In Figure 7b we show how the application of an external potential affect the electron-transfer resistance both before and after cell adhesion on SCB surface. The results presented in Figure 8 clearly indicate that after MSC recognize and adhere to the carbohydrates present in SCB there is an increase of charge transfer (R_{et}).

The performance of the SCB as a scaffold to cell adhesion and proliferation was quantitatively evaluated by the calculating the relative variation of the electron transfer

resistance (R_{et}) defined as

$$\Delta R_{et}(\%) = \left(\frac{R_{(SCB-MSC)} - R_{SCB}}{R_{SCB}} \right) \times 100, \quad (1)$$

where R_{SCB} is the value of the electron-transfer resistance of the pure SCB film, and $R_{(SCB-MSC)}$ is the value of the electron-transfer resistance of the SCB modified after exposing it to mesenchymal stem cells. The change R_{et} in the electron transfer resistance was determined for different values of the applied potential (Fig. 8). During the interaction of

SCB with stem cells, the EIS curves displayed an increasing impedance response compared to the unmodified SCB. Because the R_{et} correlated with the number of cells specifically bound to the SCB surface, the increased R_{et} reflected the biocompatibility of the sugar biopolymer. The results indicate that ΔR_{et} is influenced by the value of the applied potential, with an obvious maximum observed for 0.6 V both in the pure SCB and SCB-MSC systems. In this case, the R_{et} value is related to the more stable stem cell adhesion on the SCB film. Therefore, the obtained results demonstrated that the electric impedance technique could be used for sensitive monitoring of the dynamic interaction of the biocompatibility of the SCB.

4. Discussion

In the case of stem cells, important cellular processes, such as growth, morphology and differentiation, are controlled by extracellular signals received at the cell's surface (Trinkaus, 1969). In general, some external stimuli are received in soluble form in extracellular fluids; however, other signals are part of a neighboring cell surface. Furthermore, specific cell-surface receptors can sense a molecular signal on an opposing cell via specific binding into a cellular response. In this way, a complex cell surface code may direct intercellular interactions as diverse as the binding of pathogens to their target tissues (Sharon & Ofek, 2002) and stem cells polymer adhesion (Chung, Limpanichpakdee, Yang & Tyan, 2011). In addition, cell adhesion molecules mediate the process of cell adhesion through either cell-matrix or cell-cell interactions that include, integrins, cadherins, members of the immunoglobulin superfamily and selectins (Guo, Chen, Nie & Yao, 2006). The cell adhesion on antibody/metal/polysaccharide films has been studied by using EIS (Jiang et al., 2010), demonstrating that impedance technique is a good tool for investigating cell adhesion on biopolymer surfaces.

Cell adhesion is an important analysis by which implant surfaces may be evaluated to determine suitability for their medical use. Thus, a stable connection between the biomaterial surface and the surrounding tissue is one of the most important prerequisites for the long-term (Demetrescu, Pirvu & Mitran, 2010) success of implants. Furthermore, a strong cellular adhesion on the biomaterial surface is important. In addition, some elements of the extracellular matrix are synthesized and secreted by cells in culture, where they may play a role in cell-substratum and cell-cell adhesion. One protein that is of particular interest in determining the relationship between cells and their substrate is fibronectin as it represents one of the major molecules mediating cell attachment and playing critical roles in cell survival, proliferation and differentiation (Yamada, 1989). Then, the biocompatibility of SCB films to allow mesenchymal stem cells growth was studied since the osteoblastic cells adhesion is of interest for applications in bone tissue engineering (Anselme, 2000).

5. Conclusions

The adhesion and growth of mesenchymal stem cells were tested on a biopolymer film to evaluate the ability of SCB films as cell culture substrates. This study is the first description of impedimetric analysis for SCB as a matrix model system for stem cell adhesion. The mesenchymal stem cells reacted independently of thickness to the SCB surface. EIS technique was successfully applied for evaluated the MSC adhesion on SCB film. We demonstrated that SCB improved cell adhesion, migration and proliferation or enhance cell-material interactions for tested cells. Thus, the SCB has a good biocompatibility and large surface-to-volume ratio, confirming that it can be a good platform for the cell adhesion.

Acknowledgments

We dedicated this work to Prof. Oleg V. Krasilnikov (*in memoriam*). Fragoso would like to thank FACEPE for a graduate scholarship. Andrade and Oliveira are also gratefully for CNPq financial support (grant 310305/2012-8 and 310361/2012-5, respectively).

References

- Albuquerque, P. C. U. C., Santos, S. M., Aguiar, J. L. A., Filho, N. P., de Mello, R. J. V., Costa, M. L. C. R., Olbertz, C. M. C. A., Almeida, T. M. S., Da Silva Santos, A. H., & da Silva, J. C. (2011). Comparative macroscopic study of osteochondral defects produced in femurs of rabbits repaired with biopolymer gel cane sugar. *Revista Brasileira de Ortopedia*, 46, 577-584.
- Anselme, K. (2000). Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 21(7), 667-681.
- Baksh, D., Song, L., & Tuan, S. R. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8, 301-316.
- Boukamp, B. A. (1986). A package for impedance/admittance data analysis *Solid State Ionics*, 18-19, 136-140.
- Carvalho Junior, A. M., Santos, M. M., Barkokébas, B. B., Aguiar, J. L. A., Lima, S. V. C., & Dambros, M. (2012). Characterization of the deposition of collagen fibers and lithogenic potential in bladder of rats submitted to a sugar cane biopolymer graft. *International Brazilian Journal Urology*, 38, 544-551.

- Castro, J. E. C., Pólo, J. L., Labrado, G. R. H., Cañete, V. P., & Rama, C. G. (2010). Bioelectrochemical control of neural cell development on conducting polymers. *Biomaterials*, *31*, 9244-9255.
- Chamberlain, J. R., Schwarze, U., Wang, P. R., Hirata, R. K., Hankenson, K. D., Pace, J. M., Underwood, R. A., Song, K. M., Sussman, M., Byers, P. H., & Russell, D. W. (2004). Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science*, *303*, 1198-1201.
- Chen, F. H., Rousche, K. T., & Tuan, R. S. (2006). Technology insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nature Clinical Practice: Rheumatology*, *2*, 373-382.
- Chung, T. W., Limpanichpakdee, T., Yang, M. H., & Tyan, Y. C. (2011). An electrode of quartz crystal microbalance decorated with CNT/chitosan/fibronectin for investigating early adhesion and deforming morphology of rat mesenchymal stem cells. *Carbohydrate Polymers*, *85*, 726-732.
- Chung, T. W., Wang, S. S., Wang, Y. Z., Hsieh, C. H., & Fu, E. (2008). Enhancing growth and proliferation of human gingival fibroblasts on chitosan grafted poly(ϵ -caprolactone) films influenced by nano-roughness chitosan surfaces. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *20*, 397-404.
- Chung, T. W., Yang, M.C., Tseng, C.C., Sheu, S.H., Wang, S.S., Huang, Y.Y. et al. (2011). Promoting regeneration of peripheral nerves in-vivo using new PCL-NGF/Tirofiban nerve conduits. *Biomaterials*, *32*, 734-743.
- Coelho, M. C., Carrazoni, P. G., Monteiro, V. L., Melo, F. A., Mota, R. A., & Tenório, F. (2002). Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. *Acta Cirurgica Brasileira*, *17*, 11-13.

- Demetrescu, I., Pirvu, C., & Mitran, V. (2010). Effect of nano-topographical features of Ti/TiO₂ electrode surface on cell response and electrochemical stability in artificial saliva. *Bioelectrochemistry*, 79(1), 122-129.
- Gheorghe, M., & Guiseppi-Elie, A. (2003). Electrical frequency dependent characterization of DNA hybridization. *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 95-102.
- Grinnemo, K. H., Månsson, A., Dellgren, G., Klingberg, D., Wardell, E., Drvota, V., Tammik, C., Holgersson, J., Ringdén, O., Sylvén, C., & Le Blanc, K. (2004). Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *Journal of thoracic and Cardiovascular surgery*, 127, 1293-1300.
- Guimard, N. K., Gomez, N., & Schmidt, C. E. (2007). Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in Polymer Science*, 32, 876-921.
- Guo, M., Chen, K., Nie, L., & Yao, S. (2006). Monitoring of cell growth and assessment of cytotoxicity using electrochemical impedance spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760, 432-439.
- Houa, Y., Helali, S., Zhang, A., Jaffrezic-Renault, N., Martlet, J., Minic, C., Gorojankina, T., Persuy, M. A., Pajot-Angy, E., Salesse, R., Bessueille, F., Samitier, J., Enachid, A., Akimov, V., Reggiani, L., Pennetta, C., & Alfinito, E. (2006). Immobilization of rhodopsin on a self-assembled multilayer and its specific detection by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1393-1402.
- Jiang, X++=., Tan, L., Zhang, B., Zhang, Y., Tang, H., Xie, Q., & Yao, S. (2010). Detection of adherent cells using electrochemical impedance spectroscopy based on molecular recognition of integrin b1. *Sensors and Actuators B*, 149, 87-93.
- Lanza, R. P., Langer, R. S., & Vacanti, J. (2007). *Principles of tissue engineering*. Amsterdam ; Boston: Elsevier / Academic Press.

- Luna, D. M. N., Falcao, E. P. S., Melo, S. J., & Andrade, C. A. S. (2011). Interfacial properties of a novel pyrimidine derivative and poly(ethylene glycol)-grafted phospholipid floating monolayers. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 373(1-3), 22-28.
- Malmivuo, J., & Plonsey, R. (1995). *Bioelectromagnetism: Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields*. New York: Oxford University Press.
- Muzzarelli, R. A. A. (2011). Chitosan composites with inorganics, morphogenetic proteins and stem cells, for bone regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1433-1445.
- Navrátilová, I., & Skládal, P. (2004). The immunosensors for measurement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid based on electrochemical impedance spectroscopy. *Bioelectrochemistry*, 62, 11-18.
- Randles, J. E. B. (1947). Kinetics of rapid electrode reactions. *Discussions of the Faraday Society*, 1, 11-19.
- Reininger-Mack, A., Thielecke, H., & Robitzki, A. A. (2002). 3D-biohybrid systems: applications in drug screening. *Trends in Biotechnology*, 20, 56-61.
- Sarró, E., Lecina, M., Fontova, A., Solá, C., Gódia, F., Cairó, J. J., & Bragós, R. (2012). Electrical impedance spectroscopy measurements using a four-electrode configuration improve on-line monitoring of cell concentration in adherent animal cell cultures. *Biosensors and Bioelectronics*, 31, 257-263.
- Schwan, H. P. (1993). Mechanisms responsible for electrical properties of tissues and cell suspensions. *Medical Progress Through Technology*, 19, 163-165.
- Sharon, N., & Ofek, I. (2002). Fighting infectious diseases with inhibitors of microbial adhesion to host tissues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 267-272.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. (2006). *Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro: LTC.

- Trinkaus, J. P. (1969). *Cells into organs*. New Jersey: Prentice-Hall.
- Xue, Y., Bao, L., Xiao, X., Ding, L., Lei, J., & Ju, H. (2011). Noncovalent functionalization of carbon nanotubes with lectin for label-free dynamic monitoring of cell-surface glycan expression. *Analytical Biochemistry*, *410*, 92-97.
- Yamada, K. M. (1989). Fibronectin domains and receptors. In D. E. Mosher. *Fibronectin*. San Diego Academic Press, Inc.
- Yang, M. C., Chi, N. H., Chou, N. K., Huang, Y. Y., Chang, Y. L., Liu, H. C., Shieh, M. J., & Wang, S. S. (2010). The influence of rat mesenchymal stem cell CD44 surface markers on cell growth, fibronectin expression, and cardiomyogenic differentiation on silk fibroin-hyaluronic acid cardiac patches. *Biomaterials*, *31*, 854-862.
- Yang, M. C., Wang, S. S., Chow, N. K., Chi, N. H., Huang, Y. Y., Chang, Y. L., Shieh, M. J., & Chung, T. W. (2009). The cardiomyogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells on silk fibroin-polysaccharide cardiac. *Biomaterials*, *30*, 3757-3765.

Table Captions

Table 1. Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance result.

Sample	Potential (V)	R (Ω)	C _{dl} (F)	R _{et} (k Ω)	W
Metal electrode	-	1.01×10^6	2.41×10^{-12}	7.85	4.93×10^{10}
BPCA	0.2	2.50×10^4	2.26×10^{-2}	24.00	2.61×10^1
BPCA-MSC	0.2	9.10×10^3	2.30×10^{-11}	89.43	3.95×10^{10}
BPCA-MSC	0.4	9.10×10^3	2.30×10^{-11}	89.43	3.95×10^{10}
BPCA-MSC	0.6	8.80×10^3	2.24×10^{-11}	98.08	4.12×10^{10}
BPCA-MSC	0.8	1.49×10^4	2.23×10^{-11}	67.68	4.27×10^{10}
BPCA-MSC	1.0	1.51×10^4	2.22×10^{-11}	67.76	4.71×10^{10}

*All measurements were performed in triplicate using the MSC adhered on SCB (three samples of each analysis) and system control (SCB1-3), obtaining n=9 for each analyzed sample.

Figure Captions

Figure 1. Schematic representation of the MSC adhesion and measurement apparatus.

Figure 2. Infrared spectra of sugar cane biopolymer film.

Figure 3. 3D (a) and 2D (b) AFM topographic image ($5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$) of the SCB. A section analysis along the black line in image (b) shows that the step height (c) between higher and lower levels is approximately 259 nm.

Figure 4. Cell adhesion and morphology by SEM of MSC-SCB system (a). Higher magnification of the MSC-SCB (b).

Figure 5. Nyquist plots of the SCB at different applied potentials: SCB1 (a), SCB2 (b) and SCB3 (c).

Figure 6. Bode plots of the SCB at different applied potentials: SCB1 (a), SCB2 (b) and SCB3 (c).

Figure 7. Equivalent circuit (a) adopted to fit the impedance data and Nyquist plots (b) of the steps of cellular adhesion, before and after SCB exposition to MSC: SCB (), SCB-MSC 0.2V (ê), SCB-MSC 0.4V (), SCB-MSC 0.6V (×), SCB-MSC 0.8V () and SCB-MSC 1.0V (). Solid lines correspond to the fitting using the obtained Randles parameters.

Figure 8. $R_{et}\%$ of SCB-MSC adhesion process at different values of the applied potentials.

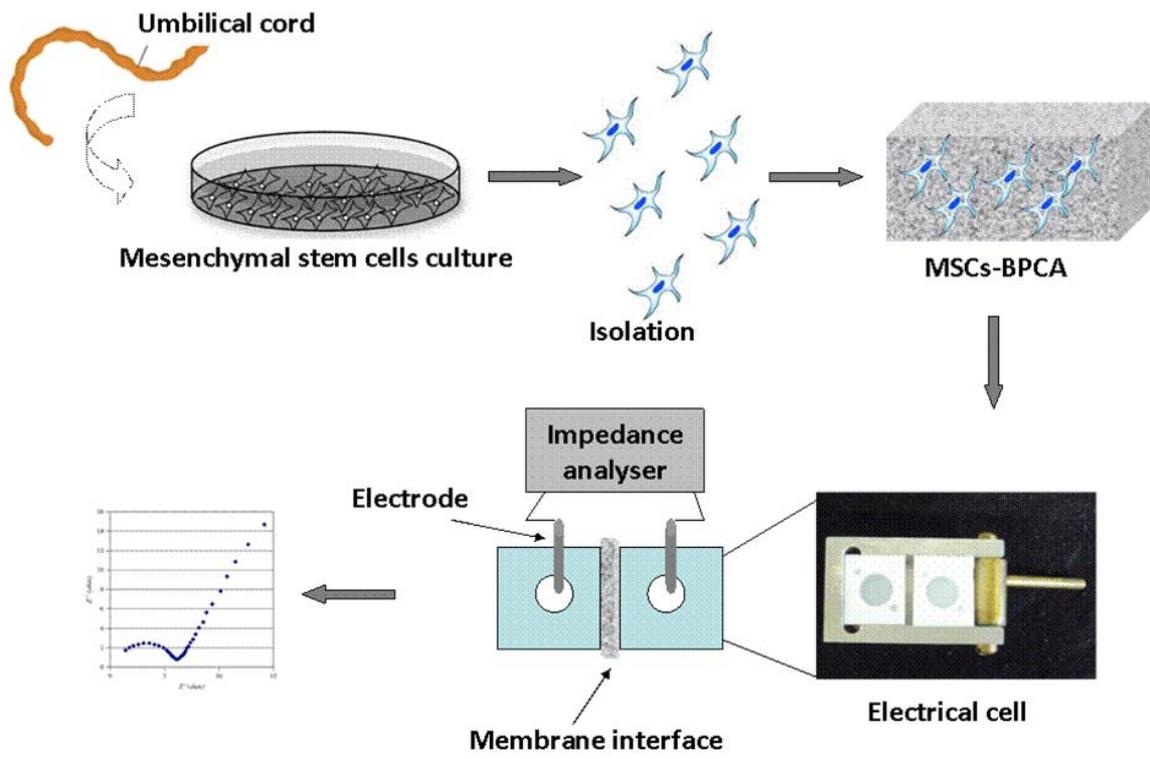


Fig. 1

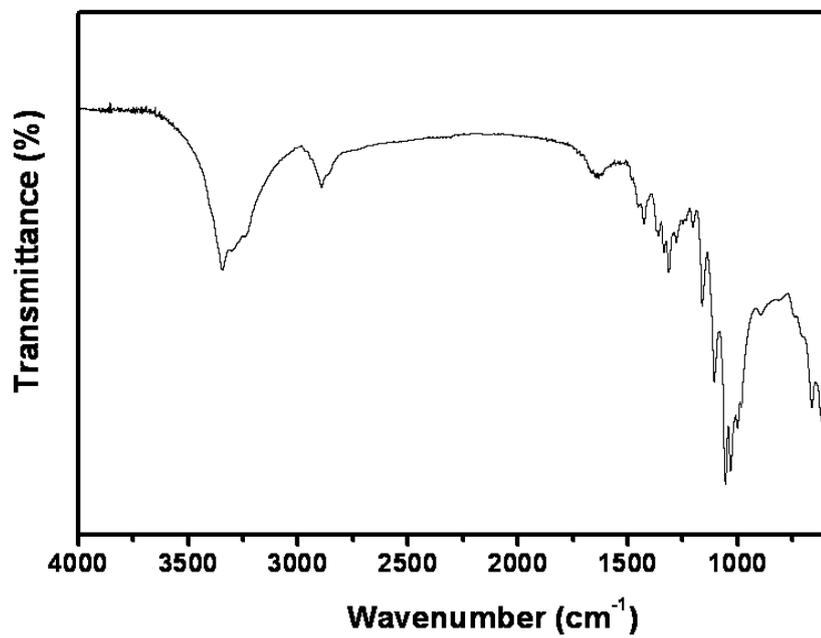


Fig. 2

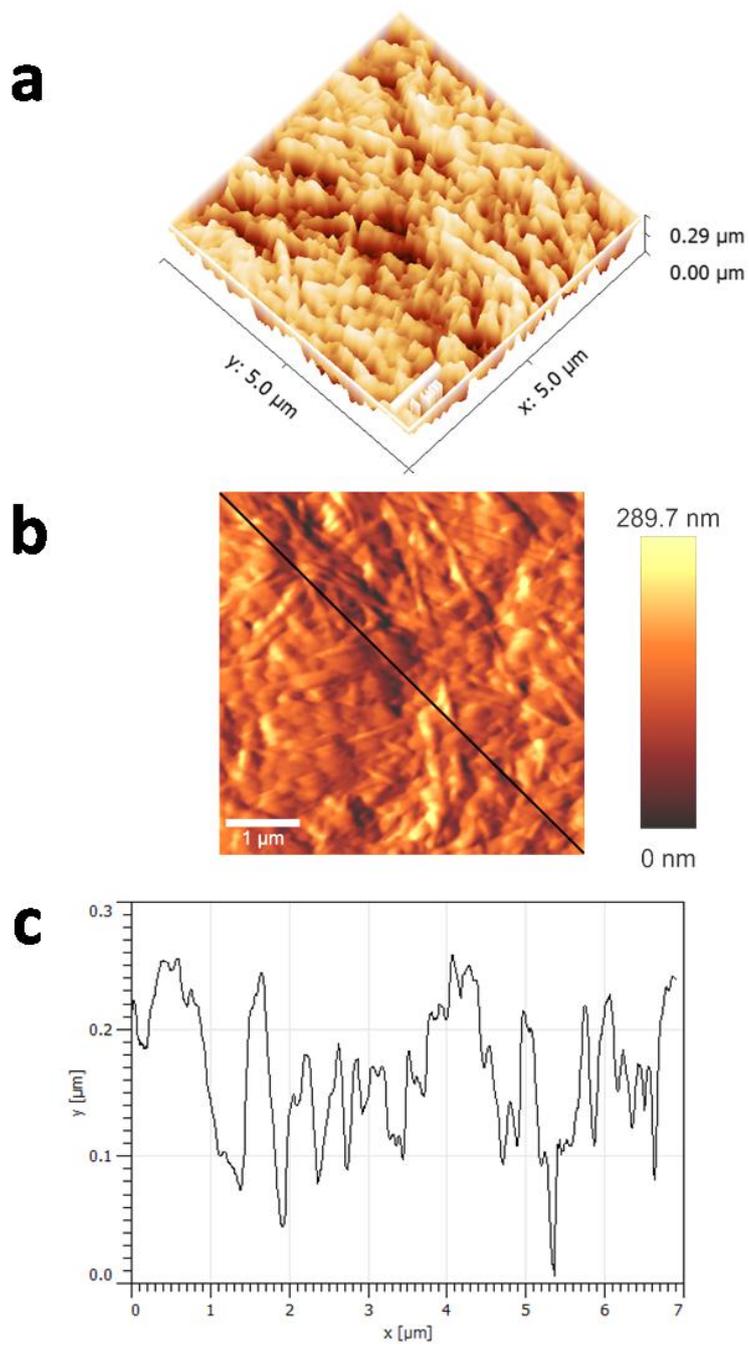


Fig. 3

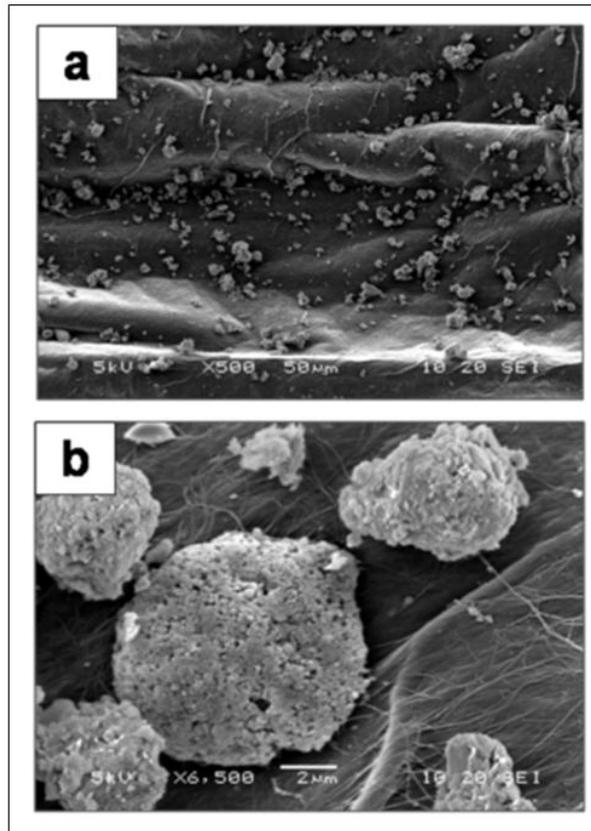


Fig. 4

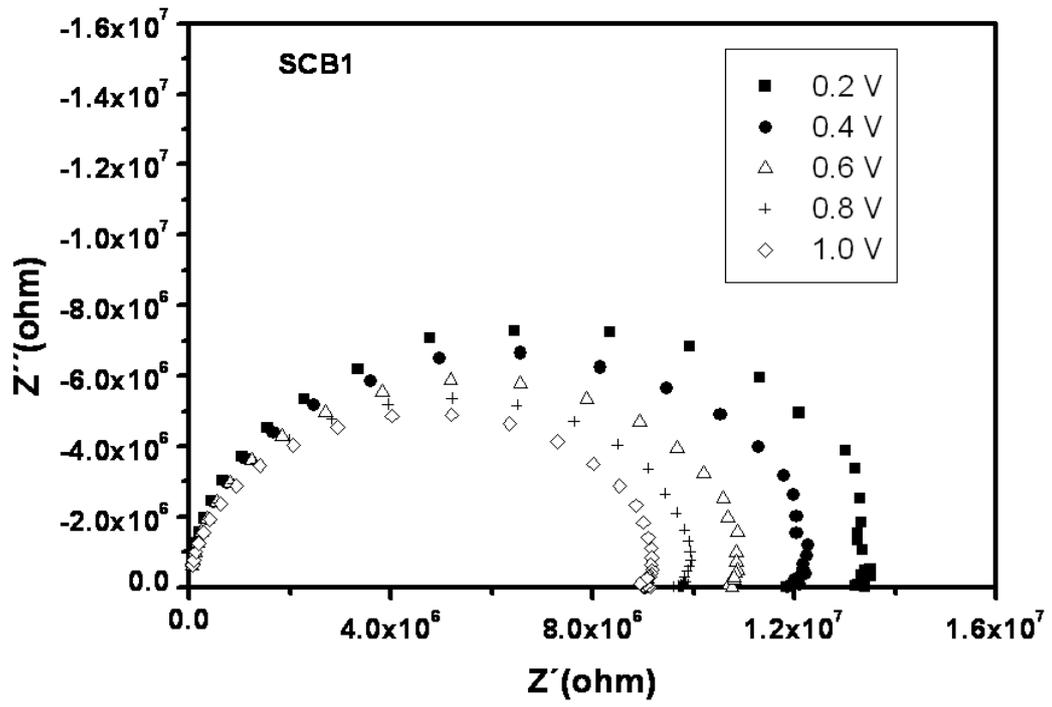


Fig. 5a

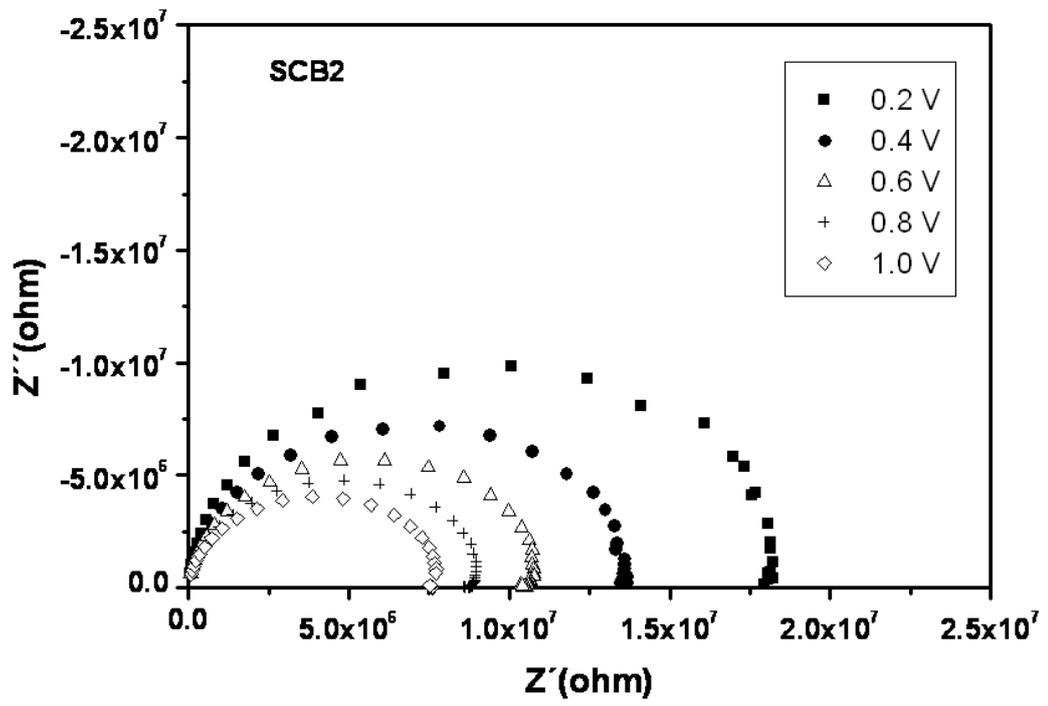


Fig. 5b

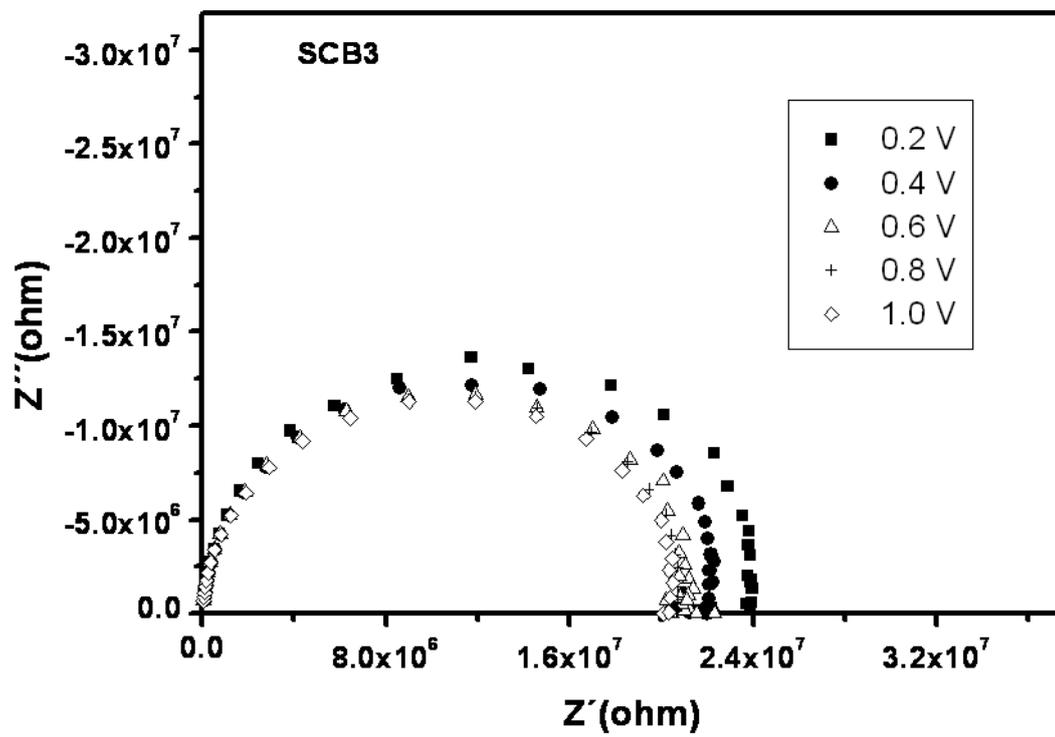


Fig. 5c

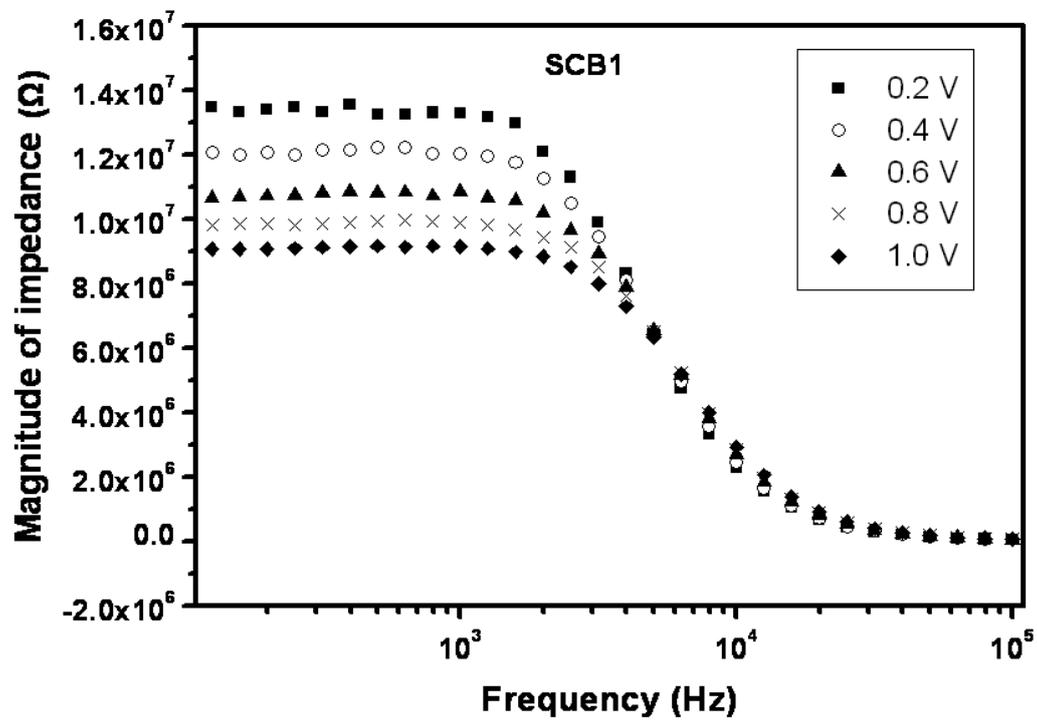


Fig. 6a

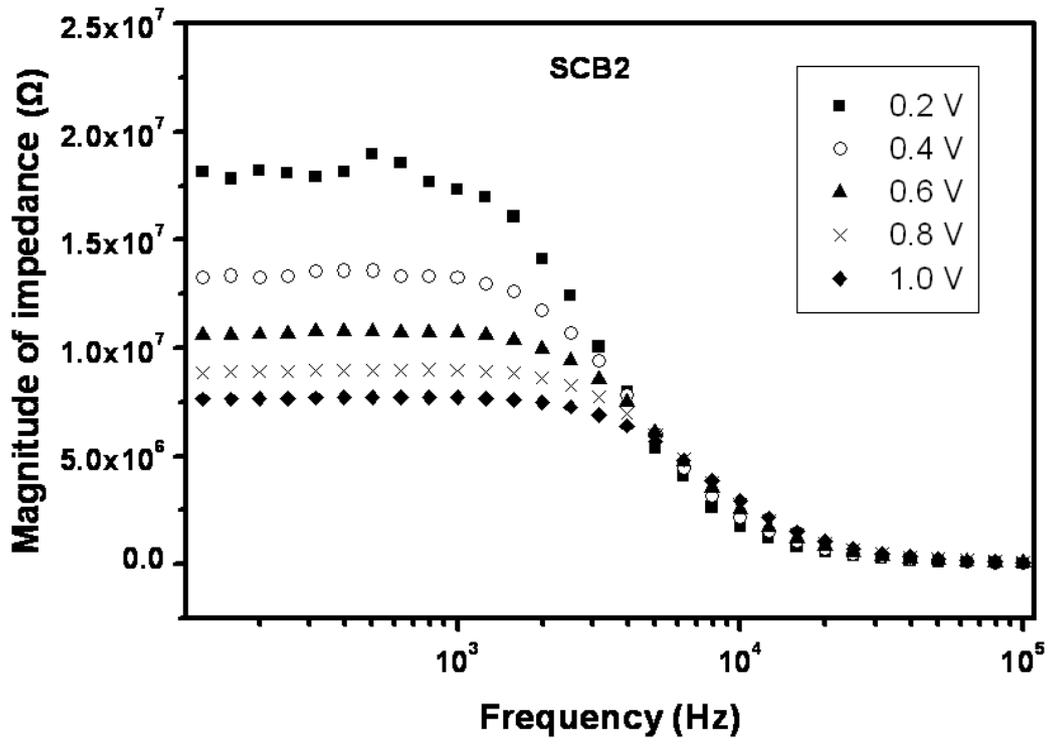


Fig. 6b

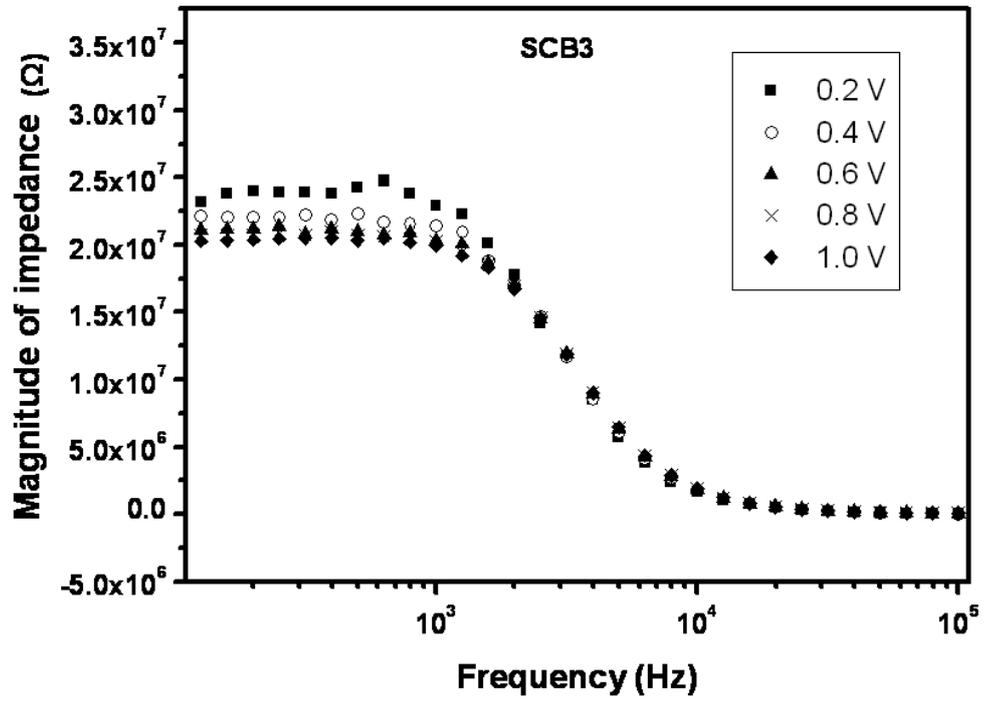


Fig. 6c

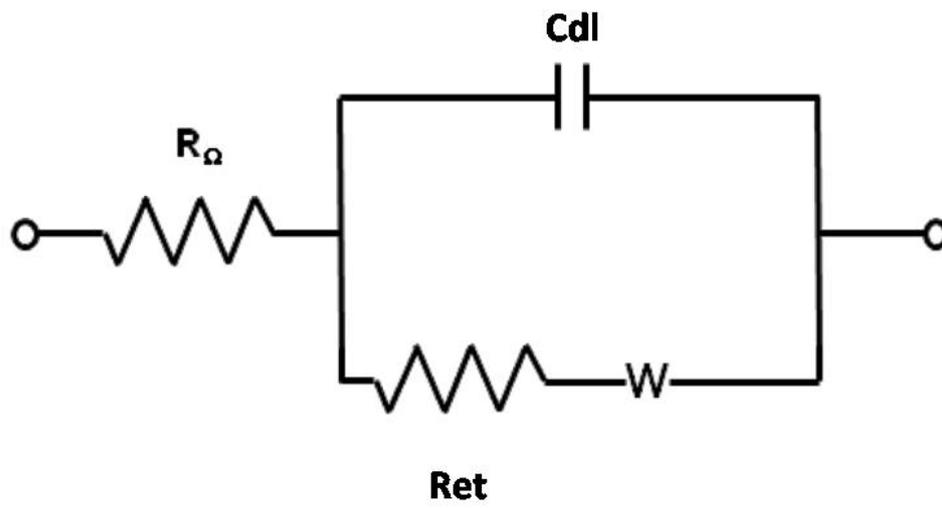


Fig. 7a

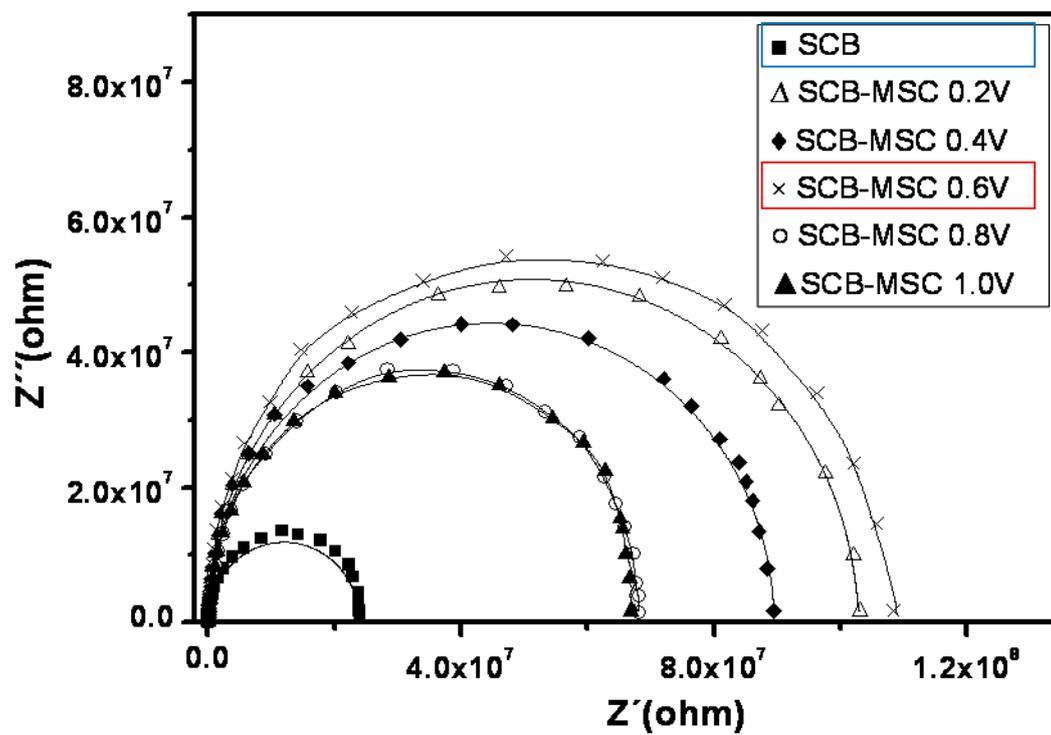


Fig. 7b

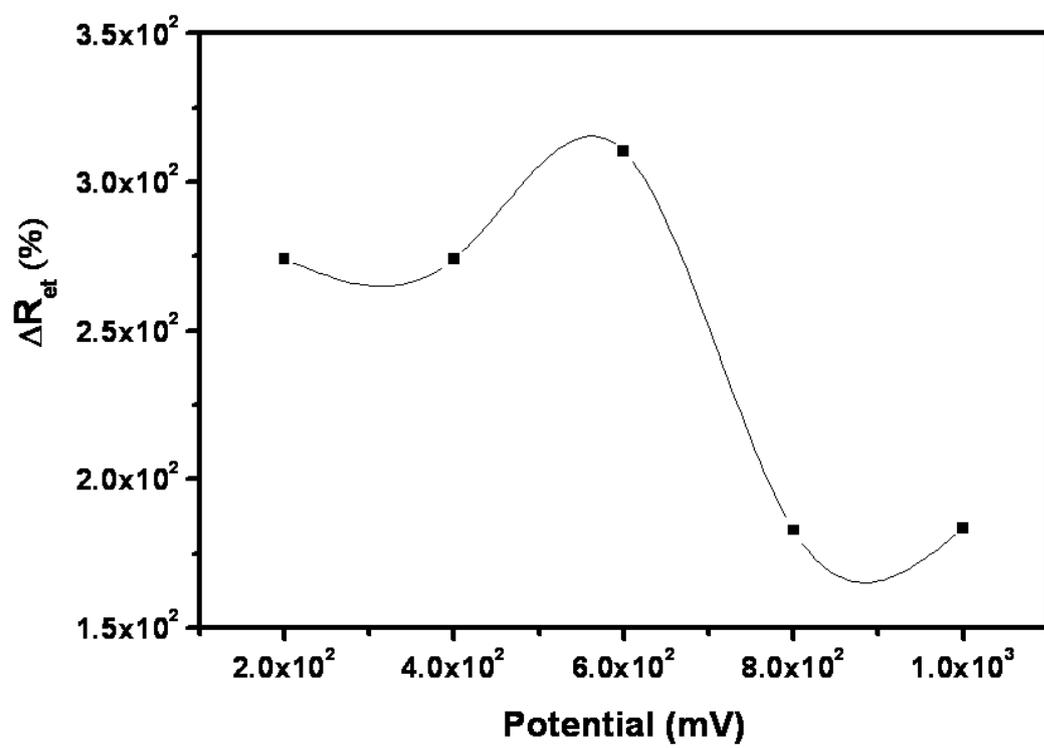


Fig. 8

CAPÍTULO V

3.9 CONCLUSÕES

- ✚ A adesão e o crescimento das células mesenquimais foram testados sobre um filme de biopolímero para avaliar a capacidade dos filmes BPCA como substratos para culturas de células.
- ✚ Este estudo é a primeira descrição de análise impedânciométrica do BPCA como um sistema modelo de matriz para a aderência das células tronco mesenquimais.
- ✚ As células mesenquimais reagiram de forma independente da espessura da superfície do BPCA.
- ✚ A técnica da EIS foi aplicada com sucesso para avaliar adesão das CTM aos filmes do BPCA.
- ✚ Nós demonstramos que o BPCA proporciona uma melhora na adesão celular, desta forma, considerado um biomaterial promissor para receber e suportar culturas de células tronco mesenquimais.
- ✚ Desta forma, o BPCA mostra uma boa biocompatibilidade e grande superfície em relação ao volume, o que confirma que ele pode ser uma boa plataforma para a adesão celular.

3.10. PERSPECTIVAS

- ✚ Este estudo esclarece a partir do uso e técnicas de caracterização, propriedades importantes do Biopolímero da Cana de Açúcar (BPCA), em relação ao cultivo e adesão das células tronco mesenquimais;
- ✚ A proposta do (BPCA) é diminuir o tempo de recuperação de pacientes que venham fazer uso dos tecidos diferenciados a partir das culturas celulares;
- ✚ Publicação de artigos em revistas indexadas.

3.11. ATIVIDADES REALIZADAS PELO ALUNO

- ✚ Obtenção dos créditos obrigatórios e eletivos;
- ✚ Congresso Brasileiro de Células - Tronco e Terapia Celular. Gramado - RS, 2011;
- ✚ ARCUS Thematic School "Organic-based nanostructured materials: From synthesis to macroscopic properties". Florianópolis - SC, 2011;
- ✚ Ciclo de Palestras do GE Day. Recife - PE, 2011.