

**PAULA BRAGA DALTRO**

***SCAFFOLD* NANOESTRUTURADO UTILIZANDO-SE CELULOSE  
BACTERIANA/FOSFATOS DE CÁLCIO PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, área de concentração em Biomateriais, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi

**ARAQUARA-SP**

**2015**

**PAULA BRAGA DALTRO**

***SCAFFOLD* NANOESTRUTURADO UTILIZANDO-SE CELULOSE  
BACTERIANA/FOSFATOS DE CÁLCIO PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, área de concentração em Biomateriais, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em    de setembro de 2015

Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida – UNESP

Prof. Dr. Jorge Enrique Rodriguez Chanfrau – Universidade de Havana

Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi  
Orientador

ARARAQUARA

2015

Este trabalho é sem dúvida destinado à minha mãe, Merciene Braga ao meu pai Gildásio  
Daltro e a Deus, que nunca me faltaram e estiveram comigo até o fim.

## AGRADECIMENTOS

A minha inspiração para sempre trabalhar em busca do crescimento profissional não é um dos historicamente famosos cientistas e sim Dr. Gildásio Daltro, um estudioso da vida e amante da medicina e da pesquisa que me ensinou que estudar e descobrir é uma arte e que ajudar o próximo é a melhor recompensa que se pode ter na vida dos esforços feitos, o meu pai.

Agradeço e sempre vou agradecer a minha mãe que sempre me ensinou e caminhou comigo para que eu nunca desistisse e sempre buscasse o que me faz feliz, me deu força e coragem para continuar em frente.

À equipe de biomateriais, ou melhor dizendo, os amigos da equipe de biomateriais, gostaria de agradecer pelos ensinamentos e ajuda sempre que as coisas pareciam que não ia dar certo. Márcio Santos, grande profissional e professor, obrigada pelos sustos quando o desânimo diante dos gráficos estava eminente. Carla Riccardi, fantástica conhecedora de regras e normas em biomateriais, que nunca me deixou esquecer que diante do mundo somos apenas uma formiguinha. Gabriel Molina, companheiro de linha de pesquisa, sempre dando uma força entre um café e outro. Edson, companheiro de SBF e incentivador da pesquisa na academia. Obrigado a todos pelo acolhimento dentro destes dois anos.

Um agradecimento especial ao pessoal do Labimuno, na Universidade Federal da Bahia, ICS. Prof. Victor Fortuna e Prof. Roberto Meyer, grandes mestres obrigada pelo acolhimento. Thiago, que me ambientou num momento de passagem rápida. Francisca, verdadeira conhecedora dos laboratórios, obrigada pela recepção.

Agradecimento fortíssimo também à MonicaYonashiro e Felipe Azevedo pela grande força com os ensaios biológicos.

Aos amigos adquiridos neste meio tempo, Barbara, Kely, Lais, Maria Cecília e Família, Sandra e Família, Taís e Gabrielen, muito obrigada, sem vocês teria sido tudo mais difícil.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Símbolos e Abreviaturas</b> .....	vi
<b>Lista de Ilustrações</b> .....	vii
<b>Resumo</b> .....	Ix
<b>Abstract</b> .....	x
<b>1. Introdução</b>	
1.1. Biomateriais .....	1
1.1.1. Biopolímeros.....	3
1.1.2. Biomateriais na Regeneração óssea.....	3
1.2. Celulose Bacteriana.....	4
<b>2. Objetivos</b> .....	7
<b>3. Referencial Teórico</b>	
3.1. O tecido ósseo.....	8
3.1.1. Composição	8
3.1.2. Estrutura	9
3.1.3. Remodelação e Regeneração	10
3.2. Fosfatos de cálcio como substitutos ósseos.....	11
3.3. Celulose Bacteriana.....	12
3.4. Testes Biológicos.....	14
<b>4. Materiais e Métodos</b>	
4.1. Local dos experimentos.....	17
4.2. Fases experimentais	
4.2.1. Produção da manta de celulose bacteriana (CB).....	17
4.2.2. Recobrimento biomimético de fosfatos de cálcio (CaP).....	18
4.2.3. Caracterização da CB/CaP.....	20
4.2.4. Avaliação de viabilidade celular.....	22
<b>5. Resultados e Discussão</b>	
5.1. Caracterização do Gel e membrana CB/fosfatos de cálcio.....	23
5.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura/MEV.....	23
5.1.2. Difração de Raios X .....	29
5.1.3. Infravermelho por Transformada de Fourier/FTIR.....	33
5.1.4. Análises térmicas.....	38
5.1.5.1. Análise Termogravimétrica/TGA.....	39
5.1.5.2. Calorimetria Exploratória Diferencial/DSC.....	40
5.1.5.3. Termogravimetria Derivada/DTG.....	41
5.2. Teste Biológicos.....	42
5.2.1. Avaliação da viabilidade celular.....	42
<b>6. Conclusões</b> .....	45
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	46

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACP	Fosfato de cálcio amorfo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CB	Celulose bacteriana
Ca	Cálcio
Cl	Cloro
CMP	Metafosfato de cálcio
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DRX	Difratometria de Raio X
DTG	Análise termogravimétrica diferencial
ECM	Matriz extracelular
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier
HÁ	Hidroxiapatita
HA C A	Hidroxiapatita carbonatada do tipo A
HA C B	Hidroxiapatita carbonatada do tipo B
HA <sub>D</sub>	Hidroxiapatita deficiente em cálcio
IL-6	Interleucina 6
ISSO	International Organization of Standardization
L	Litro
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
OCP	Fosfato octacálcico
pH	Potencial hidrogeniônico
PTH	Hormônio da paratireoide
SBF	Simulated Body Fluid
TA	Análises Térmicas
TCP	Fosfato tricálcico
TeCP	Fosfato tetracálcico
TGA	Análise termogravimétrica
TGF	Fator de crescimento tumoral

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Tabela 1:** Testes de avaliação biológica para dispositivos médicos da normativa ISO 10993.
- Tabela 2:** SBF estabelecido por Abe et al. (1990) e SBF modificado pelo grupo de biomateriais, Thomazini (2009)
- Figura 1:** Desenho de osso longo, com evidência das regiões e estrutura do osso.
- Figura 2:** Estrutura química linear da celulose bacteriana, onde a região tracejada indica as possibilidades de ligações de hidrogênio.
- Tabela 3:** Nomenclatura e fórmulas químicas dos fosfatos de cálcio de interesse biológico.
- Figura 3:** Condições utilizadas de celulose bacteriana. a) Hidrogel de celulose bacteriana. b) membrana de celulose bacteriana.
- Tabela 4:** Composição iônica do SBF padrão e SBFs modificadas.
- Tabela 5:** Siglas adotadas para as condições de tratamento das membranas e hidrogéis/SBF.
- Figura 4:** Micrografia da membrana de celulose bacteriana sem tratamento nos aumentos de 500X e 10000X.
- Figura 5:** Fotomicrografias das membranas de celulose bacteriana tratadas com solução biomimética SBF0 a SBF6, identificadas respectivamente como M0 a M6 com aumentos de 500x e 10000x. Evidência da formação de fosfatos de cálcio evidenciados pela formação de grãos na superfície.
- Figura 6:** Micrografia do hidrogel de celulose bacteriana sem tratamento nos aumentos de 500X e 10000X.
- Figura 7:** Fotomicrografias dos hidrogéis de celulose bacteriana tratadas com solução biomimética com formação de fosfatos de cálcio, reduzido a pequenas partículas secas, nos aumentos de 500x e 10000x de H0 a H5 e aumentos 500, 10000 e 20000 em H6.
- Figura 8:** Ensaio de difração de raio X de membrana de celulose bacteriana, amostras controle (MC) e sob tratamentos dos SBFs 0 a 6 (M0 a M6) com formação das fases de fosfatos de cálcio.
- Figura 9:** Análise de difração de raio X de hidrogel de celulose bacteriana, amostras controle (HC) e sob tratamentos dos SBFs 0 a 6 (H0 a H6) com as fases de fosfatos de cálcio formadas.
- Tabela 6 -** Frequências de infravermelho encontradas no fosfato de cálcio.
- Figura 10:** Espectros de membrana de celulose bacteriana sem tratamento biomimético (MC)

e com tratamento biomimético por SBF modificadas (M0 a M6).

**Figura 11:** Espectros de CB hidrogel sem tratamento biomimético (HC) e com tratamento biomimético (H0 a H6).

**Figura 12:** Análise termogravimétrica de a) membrana de CB e b) hidrogel de celulose bacteriana sem tratamento biomimético (MC e HC) e com tratamento biomimético por SBF modificadas. (M0 a M6 e H0 a H6).

**Figura 13:** Calorimetria exploratória diferencial da membrana (a) e do hidrogel (b) de celulose bacteriana sem tratamento biomimético e com tratamento biomimético por SBF modificadas.

**Figura 14:** Termogravimetria diferencial de a) membrana de CB e b) hidrogel de celulose bacteriana sem tratamento biomimético (MC e HC) e com tratamento biomimético por SBF modificadas. (M0 a M6 e H0 a H6).

**Figura 15:** Fotografia da cultura de células MC3T3-e1, nos diferentes aumentos 10x, 20x, e 40x, antes da realização dos testes de viabilidade celular.

**Tabela 7** - Percentual de células vivas após contato com CB em pequenas partículas com tratamentos de SBF (H0 – H6) e sem tratamento (HC) em diferentes concentrações.

**Figura 16** - Percentual de células vivas após contato com CB em pequenas partículas com tratamentos de SBF (H0 – H6) e sem tratamento (HC) em diferentes concentrações.

**Tabela 8** - Percentual de células vivas após contato com membrana de celulose bacteriana com tratamentos de SBF (M0 – M6) e sem tratamento (MC).

**Figura 17** - Percentual de células vivas após contato com membrana de celulose bacteriana com tratamentos de SBF (M0 – M6) e sem tratamento (MC).



## RESUMO

Paula Braga Daltro. *Scaffold* nanoestruturado utilizando-se celulose bacteriana/fosfatos de cálcio para regeneração óssea.

A produção de um scaffold de celulose bacteriana/fosfatos de cálcio (CB/PCa) obtidos a partir de SBF e SBFs modificadas foi produzida para otimizar o processo de regeneração óssea. As amostras de celulose bacteriana foram recobertas com fosfatos de cálcio por SBF estabelecido por Thomazini (2009) e seis outras condições de SBF modificadas. Foram comparadas a membrana de celulose bacteriana e o hidrogel transformado em pó, ambos produzidos nas mesmas condições de recobrimento. A formação da fase HA e outros fosfatos de cálcio, foram visualizadas em todas as amostras. Neste trabalho, foram analisadas as influências dos SBF padrão e dos SBFs modificadas (SBF 1, 2, 3, 4, 5 e 6) escolhidos na formação das fases de fosfatos de cálcio na superfície da membrana de celulose bacteriana. Também foi estudado a influência deste biofilme/CaP na viabilidade celular e na adesão e proliferação de células pré-osteoblásticas. A caracterização das amostras foi feita através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) difração de raios X – DRX, espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e análises térmicas (TGA, DSC, DTG). O teste biológico de foi feito em ambas as condições testadas e condicionadas. Não foi identificada citotoxicidade em nenhuma das amostras.

**Palavras-Chave:** celulose nanoestruturada, engenharia tecidual, biofilme, fosfatos de cálcio.

## ABSTRACT

Paula Braga Daltro. Nanostructured scaffold using bacterial cellulose / calcium phosphates for bone regeneration.

The production of a bacterial cellulose scaffold / calcium phosphates (CB / PCa) obtained from standard simulated body fluid (SBF) and modified SBFs were established by Aparecida (2009) were incorporated to optimize calcium phosphate phase formation in order to enhance bone regeneration. Samples from bacterial cellulose have been coated with calcium phosphate per SBF established by Ali et al. 2009 and six other SBF conditions changed. Two different bacterial cellulose were compared, the membrane product of dried hydrogel and commonly used in reaserch was after dried incorporated with the SBFs and the hydrogel *in natura* incorporated with the PCa was then dried and processed into hydrogel powder, both produced under the same coating conditions. The phase formation of HA and other calcium phosphates were visualized in all samples. In this work, the influence of the standard SBF and modified SBFs (1, 2, 3, 4, 5 and 6) were analyzed chosen in the formation of calcium phosphate phases on the surface of the bacterial cellulose membrane. It was also studied the influence of this biofilm / CaP on cell pre-osteoblast cells viability. The characterization of the samples was done by scanning electron microscopy (SEM) X-ray diffraction - XRD, spectroscopy in the infrared Fourier transform (FTIR) and thermal analysis (TGA, DSC, DTG).

The biological testing character was done on both conditions by the MTT reduction method. Cytotoxicity was not identified in any of the samples tested.

**Keywords:** nanostructured cellulose, tissue engineering, calcium phosphates, biofilm

## 1 INTRODUÇÃO

A evolução dos biomateriais caminha juntamente com o médico-científico há muitas décadas. A produção de materiais de interesse médico a partir de compostos naturais e biodegradáveis é de grande importância para o desenvolvimento sustentável almejado pelas indústrias e seu público alvo, que busca a melhoria da qualidade de vida e o aumento da expectativa de vida (Aparecida et al., 2007). Existem várias razões clínicas para o desenvolvimento de materiais ósseos na reconstrução de defeitos, incluindo a necessidade de implantes ortopédicos que sejam mecanicamente mais adequados ao seu ambiente biológico (Santos, 2011). O crescimento da biotecnologia tem permitido grande desenvolvimento neste sentido, o que tem refletido em avanços na área de biomateriais com aplicações médicas (Azevedo et al., 2007).

A significância e potencial de polissacarídeos apresentam desempenho comprovado cientificamente na classe de materiais médicos e aplicados em biotecnologia (Czaja et al., 2007). A celulose é o polímero com ocorrência mais abundante no planeta. Trata-se de uma estrutura formada por fibras naturalmente sintetizadas com propriedades que se sobressaem sendo, biocompatíveis, hidrofílicas, renováveis e com muitas finalidades. Apesar de conter a mesma estrutura química da celulose vegetal, a celulose bacteriana apresenta um maior número de qualidades que a tornam mais interessantes para o seu uso como um biomaterial. O aprofundamento no conhecimento da celulose bacteriana (CB) revolucionou o uso da celulose na área (Wan et al., 2006).

### 1.1 Biomateriais

Os biomateriais, embora antes não tivessem uma classificação e nomenclatura definidas, tem registros datados desde 1500 (Leal, 2006). Estes materiais com finalidade de reduzir os efeitos de uma patologia, aliviar e até mesmo tratar enfermidades são alvos de estudos profundos e extensos, pois representam uma modificação na qualidade de vida e devolução da dignidade e atividade dos pacientes que buscam essa solução.

A definição de biomateriais é motivo de constantes debates. A mais atual constatação discutida que define o que é um biomaterial é dada por Buddy D. Ratner (2004) que diz que “Biomateriais são materiais (sintéticos ou naturais; sólidos ou, as vezes, líquidos) utilizados em dispositivos médicos ou em contato com sistemas biológicos”. Esta definição tem algumas

diferenças da definição clássica dada por Helmus & Tweden, (1995) que diz que, “Um biomaterial é parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo”.

A ANVISA ao se deparar com um grande número de materiais se encaixando como biomateriais enquadrou os seguintes materiais nesta classificação: próteses, lentes, enxertos, stents, cateteres, tubos de circulação extra-corpórea e arcabouços (*scaffolds*) empregados na Engenharia de tecidos, entre outros (Soares, 2005). Estes ainda podem ser divididos entre naturais e sintéticos ou ainda natural modificado.

A aceitação para a aplicação de um biomaterial tem que passar por uma série de ensaios que seguem a normativa ISO 10993, “*International Organization for Standardization 10993, - Biological Evaluation of Medical Devices* . Esta normativa classifica o material de acordo com o seu potencial de produzir irritação e sensibilização incluindo na sua classificação pré-testes com diferentes níveis de exposição e contato, detalhes para procedimentos de testes *in vivo*, e fatores chaves para a interpretação de resultados e classificação do material em teste.

Os critérios para a adoção de algum material como biomaterial aceito para a aplicação *in vivo* e no mercado analisa os perigos que um produto pode trazer para que este não seja incluído no mercado aleatoriamente, evitando assim inúmeros efeitos adversos que acarretariam em problemas futuros para a sociedade e os pacientes em uso destes materiais.

Um dos tipos de biomateriais explorados mais abundantemente são os materiais de reposição óssea, incluindo os dentários. Muitos estudos são documentados com análises em busca do material com melhores propriedades para realizar este papel. Os critérios mais procurados são a biofuncionalidade e a biocompatibilidade. A biofuncionalidade é o conjunto de propriedades que permite ao material desempenhar a função para a qual ele foi criado. A biocompatibilidade trata da recepção que este material vai ter ao entrar em contato com o meio para o qual ele foi proposto, com uma taxa mínima e não significativa de rejeição. (Boschi, 1995).

Existem ainda os materiais considerados bioinertes e os bioativos, onde o bioinerte deve ser um material com proporções não significativas de indução de alterações no meio ao qual ele foi inserido, enquanto os bioativos promovem uma atividade direcionada à atividade para o qual ele foi proposto no meio em que ele foi inserido, entrando em contato com o tecido e promovendo interações.

A bioatividade, a biocompatibilidade e a biofuncionalidade são propriedades

fundamentais para o sucesso na aplicação de um biomaterial com destino de substituição óssea ou promoção da reposição do conteúdo ósseo. A busca por um dispositivo que promova ligação físico-química com o meio *in vivo*, tem sido motivo de pesquisas incansáveis a procura da osteoindução, induzindo uma resposta promotora de osteogênese estimulando a produção de tecido ósseo e da osteocondução, quando existe a promoção de um arcabouço para a produção de um novo osso (Marzola e Pastori, 2006).

### **1.1.1 Biopolímeros**

Os biopolímeros podem ser definidos como qualquer proteína, ácido nucléico, polissacarídeo, produzido por um organismo vivo. A matéria-prima principal de um biomaterial biopolimérico para a sua manufatura é uma fonte de carbono renovável, geralmente um carboidrato (Borschiver et al., 2008).

Os polissacarídeos obtidos pela ação de microorganismo tem despertado muito interesse atualmente. Estes polissacarídeos, conhecidos como biopolímeros, são obtidos por processos fermentativos. Possuem capacidade de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso. A produção de polissacarídeos extracelulares é muito comum em muitos gêneros de bactérias. Esses exopolissacarídeos podem ser excretados para o meio como um muco ou formar uma cápsula ao redor da célula. (Borges et al., 2004)

### **1.1.2 Biomateriais na Regeneração Óssea**

Os métodos tradicionais para reparação de defeitos ósseos geralmente incluem autoenxerto (transplantado do indivíduo para ele mesmo), aloenxerto (transplantados entre indivíduos geneticamente diferentes, porém da mesma espécie) de osso esponjoso e aplicação de enxertos vascularizados da fíbula e da crista ilíaca e atualmente os enxertos aloplásticos, que correspondem a biomateriais, classificados ou subdivididos conforme sua origem (natural ou sintética) ou sua composição química (metálicos, cerâmicas, polímeros ou compósitos) (Oliveira et al., 2010). Embora estes sejam os tratamentos padrões, estes podem ser ineficientes, uma vez que os enxertos ósseos são avasculares e dependentes de difusão.

A partir da necessidade de se utilizar para regeneração óssea cálcio, fósforo e outros íons que fazem parte da formação do osso passou a se buscar uma forma de produzir fosfatos de cálcio a fim de reduzir a necessidade de enxertos autógenos e alógenos. Várias metodologias de síntese têm sido utilizadas e aprofundadas, principalmente para a formação de hidroxiapatita

(HA). (Olyveira, et al., 2015)

Um dos métodos mais utilizados, na mimetização dos minerais presentes no osso, é a técnica de precipitação, que envolve reações via úmida entre precursores de cálcio e fósforo com controle de temperatura e pH. Dentre estes se pode destacar para a formação de fosfatos de cálcio, em especial a hidroxiapatita, os métodos sol-gel e SBF (do termo em inglês “*Simulated Body Fluid*”).

O SBF é uma solução de co-precipitação descrita inicialmente por Abe et al. (1990) que reúne os sais que, em condições ambientais estáveis e pré-determinadas, gera os cristais formadores de hidroxiapatita. Na Tabela 2 observa-se a modificação na ordem da adição de sais estabelecida pelo grupo de biomateriais da faculdade de química da UNESP com relação à conhecida ordem promotora do SBF de Kokubo.

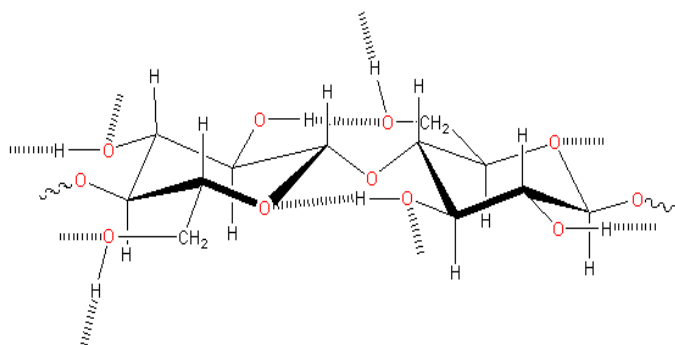
**Tabela 2:** SBF estabelecido por Abe et al. (1990) e SBF modificado pelo grupo de biomateriais, Thomazini (2009)

Abe e col.			Grupo de Biomateriais		
Ordem	Substância	Massa	Ordem	Substância	Massa
1	NaCl	7,996g	1	NaCl	8,003g
2	NaHCO <sub>3</sub>	0,335g	2	NaHCO <sub>3</sub>	0,335g
3	KCl	0,224g	3	KCl	0,224g
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,174g	4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,174g
5	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,305g	5	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,071g
6	HCl	40mL	6	HCl	40mL
7	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,368g	7	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,368g
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,071g	8	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,305g
9	NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	6,057g	9	NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	6,057g

## 1.2 Celulose Bacteriana

Destaque entre as formas de celulose conhecidas a celulose bacteriana, é produzida por um microrganismo e apresenta aspecto esbranquiçado e gelatinoso. A biossíntese desta requer complexos de carbono utilizados pelo produtor da celulose como fonte de nutrição, para que a bactéria possa polimerizar estes compostos de carbono em cadeias glicosídicas β-1,4, que em repetição de cadeia é conhecida como celobiose. (Chawla et al., 2009).

**Figura 1:** Estrutura química linear da celulose bacteriana, onde a região tracejada indica as possibilidades de ligações de hidrogênio.



A celulose bacteriana, descoberta por Brown em 1886, apresenta uma estrutura nanofibrilar única. Estruturalmente a CB se apresenta igual à celulose vegetal, no entanto a celulose vegetal se encontra em combinação com a lignina, pectina e hemicelulose, sendo responsável por em média 40% da madeira extraída enquanto as demais substâncias ocupam o restante deste percentual. Desta forma, a celulose vegetal precisa passar por um agressivo tratamento químico, demandando um esforço financeiro e temporal maior para a sua produção de forma pura e isolada além de não necessitar de um espaço físico tão extenso para a sua produção como a celulose vegetal que vitimiza as florestas para a sua extração (Wan et al., 2006). Suas qualidades e uniformidade foram determinantes para o seu reconhecimento dentre os biomateriais (Aparecida et al., 2007). A bactéria *Gluconacetobacter xylinus* é destacada como uma grande produtora de celulose, em uma escala que permite o seu uso na indústria, transformando-a em um dos mais promissores biomateriais da classe dos biopolímeros.

Esta celulose é conhecida pela criação de uma estrutura ambiental favorável e protetora para a bactéria que a produz, uma das razões pela qual a CB tem tido muito reconhecimento na área de engenharia tecidual. Nos últimos anos esta tem sido explorada como um novo substituto tecidual acelerando e auxiliando na cicatrização, permitindo uma otimização deste processo. Algumas de suas excelentes propriedades mecânicas e biológicas já foram descritas (Recouvreux, 2008). Estas características, somadas à formação nanoestrutural e porosa da CB a torna uma matriz promissora, que tem permitido a este biomaterial espaço com um enfoque no auxílio da formação de novos tecidos.

A organização de um complexo fibrilar nanoestruturado é uma das qualidades da celulose bacteriana. A formação desta camada em escala nanométrica ampliou a sua qualidade de proteção, de armazenamento de água, de troca de gases, elasticidade e conformabilidade, podendo ser moldada *in situ*, promovendo a interação específica com o tecido, com boa porosidade e resistência mecânica (Czaja et al.,2006). Formada por grupos hidroxilas que estabelecem interações do tipo ligacoes de hidrogenio intra e intermoleculares, sua membrana permite ainda que seja manipulada para absorver fluídos aumentando as possibilidades e aplicações biotecnológicas.



## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a obtenção biomateriais a partir do uso de um polímero natural produzidos a partir de celulose bacteriana e fosfatos de cálcio voltadas para a regeneração óssea; que apresentem propriedades para implantação no corpo humano.

Preparar compósitos celulose bacteriana/fosfatos de cálcio a partir de uma solução de coprecipitação, contendo os íons formadores dos fosfatos de cálcio de interesse biológico.

Caracterizar e correlacionar às membranas de celulose bacteriana puras nas condições *in natura*, ou hidrogel, reduzido a pequenas partículas após tratamentos com fosfatos de cálcio de interesse biológico com o propósito da formação de um compósito para preenchimento ósseo, e de membrana de celulose bacteriana com deposição de fosfato de cálcio, e as suas propriedades físico-químicas.

Avaliar citotoxicidade dos compósitos a partir do teste de MTT com o uso de células pré-osteoblásticas murina MC3T3-e1 subclone 14.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Tecido ósseo

O osso é um tecido, resultante da mesoderme, metabolicamente ativo que está sob constante remodelação. Esta propriedade permite que a remodelação e a regeneração sejam artificios disponíveis em resposta a injurias, tais como fratura e a recuperação do tecido envolvendo implantes. Este tecido possui três funções principais: suporte a estrutura do corpo o que confere a capacidade de movimento; proteção de alguns órgãos contra cargas externas; e reserva de íons em sua maioria cálcio e fosfato utilizados na remodelação e manutenção da homeostase sérica. (Moore, 2007)

O tecido ósseo é uma rede complexa que envolve diferentes tipos celulares e a matriz extracelular. O dinamismo desta rede ocorre devido ao uso precisamente regulado de íons pelas células e a capacidade de calcificação da matriz extracelular (ECM), o que também contribui para as propriedades do tecido. (Gardner et al., 1988)

##### 3.1.1 Composição

O suprimento de vasos sanguíneos do tecido ósseo é extremamente rico. Este fator aumenta ainda mais a complexidade na substituição deste tecido por um material. Além disso, existem diferentes tipos de osso com diferentes necessidades de suprimento. Cada um destes tipos apresenta uma variação na sua arquitetura, composição celular, vascularização e mineralização.

O osso tem na sua composição as células, as substâncias intercelulares (a matriz orgânica e a matriz inorgânica), os vasos e nervos. As principais classes de células que participam da formação e composição do tecido ósseo são os osteoblastos e os osteoclastos. A matriz óssea consiste em componentes orgânicos (35%) e inorgânicos (65%). A matriz óssea orgânica contém fibras de colágeno do tipo I (90%); fibras colágenas proteoglicanos, substância fundamental rica em condroitinossulfato e ácido hialurônico; e proteínas não colagenosas. O componente inorgânico do osso é representado predominantemente pelos depósitos de fosfato de cálcio com as características cristalinas da hidroxiapatita. Os cristais são distribuídos ao longo do comprimento das fibras colágenas por meio de um processo de associação auxiliado pelas proteínas não colagenosas. (Gardner et al, 1988; Moore, 2007, Kierszenbaum, 2012)

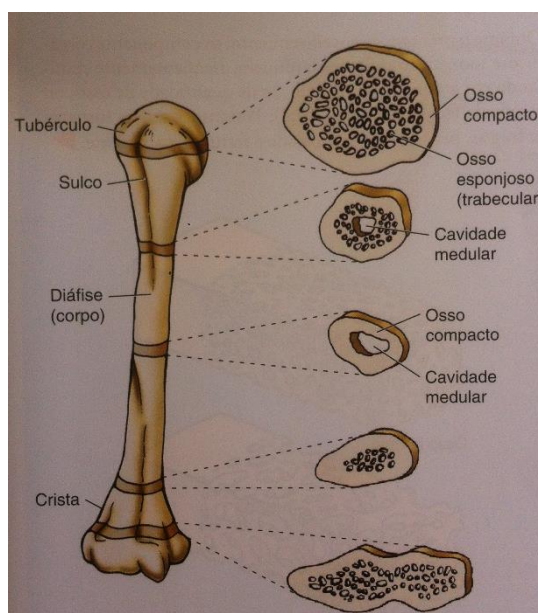
Essas substâncias que compõem este tecido variam de acordo com a idade com a raça, com fatores genéticos, com o estilo de vida e por isso representa um constante desafio para os médico e cientistas quando o assunto é a sua substituição ou regeneração.

### 3.1.2 Estrutura

Foram e ainda são inúmeras as tentativas de mimetizar a arquitetura surpreendente do osso. A sua capacidade de resistir às forças de tensão e pressão sempre foram um grande fascínio e a compreensão destas características e suas propriedades sempre foram uma necessidade, pois o aperfeiçoamento dos biomateriais voltados para as enfermidades e deficiências ósseas sempre será um desafio.

Existem dois tipos de ossos, o osso trabecular dotado de espaços intercomunicantes e osso compacto. Estes se diferenciam pelos seus interespaços e pela quantidade relativa de material sólido (Figura 2). A disposição e a proporção entre o osso esponjoso e o compacto no corpo diferem de acordo com a sua função e utilidade. (Gardner et al, 1988; Moore, 2007)

**Figura 1:** Desenho de osso longo, com evidência das regiões e estrutura do osso.



**Fonte: Moore, 2007**

### 3.1.3 Remodelação e Regeneração

O osso é um tecido em constante atividade. Existem dois tipos celulares principais responsáveis pela homeostase do sistema esquelético, os osteoclastos e os osteoblastos. Os osteoblastos são responsáveis pela formação da matriz orgânica do osso, assim como pela sua mineralização. Os osteoclastos por sua vez são responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo através de atividades proteolíticas, promovendo um ambiente ácido que contribui para a desmineralização e degradação da matriz óssea. (Moore, 2007)

Apesar de parecer um tecido estável, o osso está em constante processo de remodelação, reconstrução e reabsorção. Em média 150 dias é o tempo de vida de um osteoblasto/osteoclasto. Também possuindo um papel crítico os osteoclastos são fundamentais na manutenção do osso normal através do reparo de microfraturas e reabsorção de áreas ósseas que contenham focos de osteócitos antigos não vitais. Na reabsorção do osso, fatores de crescimento, tais como a proteína morfogenética óssea (BMP), e citocinas, são liberados e induzem a formação de osteoblastos formadores de osso ativo em pleno cumprimento das suas funções. (Neville et al, 2009).

Os osteoblastos transmitem e recebem sinais ligados a remodelação óssea, tais como estrógeno, vitamina D, o hormônio da tireoide e paratireoide (PTH), além de secretar fatores de regulação, interleucinas (IL-6), Interferon- $\gamma$  e Fator de Crescimento Tumoral –  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ), controlando assim a mineralização da matriz (Andia et al. 2006). Essa célula também transmite sinais de adesão que são fatores fundamentais para o estabelecimento da produção de osso. Sem essa cascata de sinalização não é possível a neoformação óssea ou o freio da produção de osso ativo. Os osteoblastos são também responsáveis pela sintetização de proteínas não colagenosas da matriz que incluem osteocalcina, osteopontina e osteonectina, com propriedades específicas na mineralização do osso.

Os osteoclastos são ligados à superfície óssea e o processo de reabsorção sendo auto-regulável alguns fatores podem provocar o rompimento da adesão do osteoclasto ou apoptose deste, como o estrógeno e TGF-  $\beta$ . Outros hormônios podem atuar como supressores de apoptose, tais como o paratormônio e a Interleucina-1. Desta forma, o sistema fisiológico e o imune estão intimamente ligados ao processo de remodelação óssea. (Andia et al., 2006)

O processo de remodelação ocorre então inicialmente a partir da ativação dos osteoclastos, que acontece a partir da exposição da matriz óssea mineralizada. Após a reabsorção da matriz exposta células osteoprogenitoras migram para o local e com

diferenciação de osteoblastos dá-se início ao processo de nova mineralização da matriz óssea.

No presente trabalho não é abordado o arcabouço proposto neste nível de sistema dinâmico, no entanto é avaliada a resposta do osteoblasto, que é um dos protagonistas da formação de tecido ósseo novo, a nível de avaliação da viabilidade celular, visando testes posteriores em um sistema de remodelação e absorção mais complexo.

### **3.1.4 Fosfatos de cálcio como substitutos ósseos**

Os fosfatos de cálcio compõem o tecido ósseo em sua maioria. O osso é complexo e sofre influências de outros tecidos para determinar a sua composição e estrutura. As células do tecido ósseo são, osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, condrócitos, células endoteliais e células hematopoiéticas e outras. Em sua formação e reabsorção as células ósseas se agrupam em duas séries, a de linhagem osteoblástica, responsáveis pela formação e mineralização da matriz óssea e as de linhagem osteoclástica pela reabsorção da matriz óssea, responsáveis pela homeostase dos níveis corpóreos de cálcio. A mineralização da matriz extracelular promove a dureza do suporte estrutural. Em caso de desequilíbrio metabólico dos íons de Ca ocorre uma perda na parte estrutural em função da estabilização da metabólica (Judas et al., 2012).

A manutenção e reposição adequada dos íons perdidos é um dos grandes desafios da engenharia de tecidos ósseos. Segundo Henn e González (2010), o osso é diferenciado dos demais tecidos conjuntivos menos rígidos por ser constituído por aproximadamente 10% de água, 70% de minerais e 20% de matriz orgânica. A matriz mineral do osso constitui aproximadamente 65% do peso do osso em fosfato de cálcio ( $\text{CaPO}_4$ ), além de conferir as características de suporte do corpo, como rigidez e resistência mecânica. Os componentes inorgânicos encontrados mais abundantemente são o fósforo e o cálcio, comumente encontrados na forma de cristais de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ), além de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), embora cinco vezes menos e fosfato de magnésio em uma menor quantidade, mas relevante. Em condições fisiológicas os íons  $\text{PO}_4^{3-}$  e o  $\text{Ca}^{2+}$  não se encontram em estado metaestável devido à presença de constituintes como o pirofosfato ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ). A ossificação envolve a precipitação dos sais do osso na matriz, por meio de um equilíbrio físico-químico, envolvendo os íons  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfato inorgânico ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ), fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Judas et al. 2012).

Os fosfatos de cálcio têm influência direta na adesão formação de novo tecido ósseo e o biomaterial voltado para a regeneração óssea precisa de fosfato de cálcio disponível para garantir a adesão celular no biomaterial implantado. A adesão celular ocorre por intermédio de proteínas receptoras transmembrana, ligadas diretamente ao citoesqueleto (Baxter et al., 2002).

O citoesqueleto define a morfologia celular e o seu comportamento, movimento e dureza, que por sua vez refletem diretamente na adesão celular (Alberts et al., 2004). A adesão focal é um tipo de adesão celular que ocorre através de um complexo molecular que liga o citoesqueleto ao meio extracelular, permitindo e mediando a adesão celular à superfície do biomaterial. A ligação ocorre através de integrinas receptoras que são ligadas ao citoesqueleto via moléculas específicas. O processo de adesão celular é fundamental para o funcionamento e eficiência do biomaterial (Judas et al. 2012).

Na Tabela 3, segundo Aoki (1991), é mostrada a razão Ca/P dos diferentes fosfatos de cálcio e precursores da formação de Hidroxiapatita, fundamental na formação óssea.

**Tabela 3:** Nomenclatura e fórmulas químicas dos fosfatos de cálcio de interesse biológico.

<b>Fosfato de Cálcio</b>	<b>Fórmula Química</b>
<b>Fosfato Tetracálcico (TeCP)</b>	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$
<b>Hidroxiapatita (HA)</b>	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
<b>Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)</b>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$
<b>Fosfato tricálcico (<math>\alpha</math>, <math>\alpha'</math>, <math>\beta</math>, <math>\gamma</math>) (TCP)</b>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
<b>Fosfato octacálcico (OCP)</b>	$\text{Ca}_8\text{P}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
<b>Metafosfato de cálcio (<math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\gamma</math>) (CMP)</b>	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$
<b>Fonte: Aoki, 1991</b>	

### 3.2 Celulose Bacteriana

Identificada pela primeira vez por Adrian Brown em 1886 o que hoje se conhece como celulose bacteriana por ele foi identificado inicialmente como uma manta gelatinosa formada na superfície do caldo de fermentação do vinagre. Ao realizar uma visualização no microscópio deste gel em manta notou-se a presença de bactérias. A celulose produto da *G. xylinus* tem uma formação de microfibrilas que formam uma estrutura tridimensional.

#### **Hidrogel**

Hidrogéis, ou géis contendo água, são polímeros caracterizados por sua hidrofilicidade

e insolubilidade em água. Em meio aquoso, esses hidrogéis intumescem até um volume de equilíbrio, mas preservam seu formato original. A hidrofilicidade é devida à presença de grupos solúveis em água tais como, OH, COOH, CONH, SO<sub>3</sub>H, entre outros presentes na cadeia polimérica (Oliveria et al, 2009).

A hidrofilicidade da película hidratada de celulose pode ser explicada pela presença de poros e canais em sua estrutura, dependendo diretamente da extensão de sua área superficial interior, assim como dos espaços intersticiais presentes na matriz de celulose hidratada. A água aparece na estrutura envolvendo as unidades manométricas e as conectando. O hidrogel formado na superfície do meio de cultura apresenta extrema hidrofilicidade, aonde cerca de 99% de sua massa total é água e 1% celulose e boa transparência.

O hidrogel da celulose bacteriana pode reter até 1000% de água, sendo que essa retenção depende diretamente do volume do meio de cultura utilizado para a produção da membrana (Barud, 2010). Pesquisadores relatam a importância e as utilidades e diferenças no processo de adesão celular no uso de polímeros hidrofílicos (Caccavo et al, 2015 e Aouada et al, 2009).

A quantidade de água adsorvida pelos hidrogéis geralmente está relacionada com a hidrofilicidade das cadeias e a densidade de agente de reticulação utilizada na síntese. Dependendo da natureza dos componentes que originam os hidrogéis (neutro ou iônico) ou de substâncias incorporadas à matriz, o hidrogel pode responder diferentemente ao se alterar as características do meio externo, tais como força iônica, pH, ou quantidade de um analito químico específico (Aouda et al, 2009). O fato de a espessura e conseqüentemente a transparência do biofilme de CB poder ser facilmente controlada através do tempo de cultivo é um fator extremamente interessante para a formação de diferentes proporções de acordo com a sua finalidade (Barud et al, 2010).

### **Membrana Desidratada**

O gel produzido, ou seja, a membrana *in natura* da celulose bacteriana pode passar por diferentes processos de secagem, sendo estas a secagem em estufa, a liofilização, e processos que envolvem temperatura e pressão. Após a retirada da água residual pelo efeito da temperatura, a CB irá apresentar pequena reidratação, de aproximadamente 6%. Isto ocorre porque os poros sofrem um colapso fazendo com que a água esteja apenas adsorvida na superfície. Entretanto, depois de liofilizada a celulose produzida pelas bactérias pode reabsorver até 70% do teor original de água por meio do reintumescimento. Membranas hidratadas de CB

podem ser ainda exaustivamente lavadas permitindo a troca da água por outro tipo de solvente permitindo modificações. É possível introduzir, por exemplo, metanol, acetona, n-hexano, com o mesmo volume de água na CB, mantendo a estrutura de rede (Barud, 2010).

### 3.4 Testes Biológicos

A utilização de *scaffolds* como matriz extracelular para crescimento ósseo é abordada com frequência. No entanto ainda existe a busca por um biomaterial mais adequado. Para o aperfeiçoamento destes materiais e a regularização dos mesmos foi criada a normativa ISO 10993 (do termo em inglês, *International Organization for Standardization*), que delinea os caminhos a serem percorridos para que um novo biomaterial possa ser considerado um material seguro para utilização em humanos.

No entanto, embora de extrema importância para a produção eficaz de um biomaterial, testes *in vivo* implicam em discussões e requisitos éticos maiores e necessários. Em 1959, no livro “*Principles of Human Experimental Technique*”, ou “Princípios da Técnica Experimental Humana” foi introduzido o conceito dos 3 Rs, que trazia a idéia de refinamento, redução e substituição (dos termos em inglês, *Refine, Reduction e Replacement*), dos testes em animais, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Além disto o uso de animais na ciência exige um grande número de amostras e apresentam custo elevado.

O teste *in vitro* é uma das etapas que a ISO 10993 estabelece para que o uso *in vivo*, como etapa final, de biomateriais seja possível. O teste *in vitro* minimiza os riscos, por fazer uso de material biológico extra-corpóreo. Este apresenta menor custo para a produção de amostras e realização de diferentes testes, apresenta menor risco, diminui a utilização de animais, requer condições ambientais relativamente menos controladas, além de requerer um número de amostras menor. A partir daí se afinam os materiais aprovados por via *in vitro* para então serem aplicados *in vivo*.

A normativa traz como pré-requisitos para se estabelecer um biomaterial seguro para uso médico o conhecimento e realização de testes quanto à produção, esterilização, caracterização e resposta biológica local e sistêmica do material alvo do estudo. A primeira etapa avaliativa do biomaterial é o teste de citotoxicidade, utilizando como resultado de exclusão ou inclusão a morte ou não das células escolhidas para a situação imposta ao material. Dentre as diferentes metodologias utilizadas para avaliar o efeito citotóxico que um material possa ter nas células, um destes que é frequentemente utilizado é o MTT [Brometo de 3-(4,5-



dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio], que determina a viabilidade celular a partir da sua capacidade de clivar o anel tetrazólio presente no sal (Mosmann 1983). O resultado dessa clivagem é uma mudança na cor visível, de amarelo para azul escuro (formazan).

A interação entre um material e o ambiente em que ele será inserido também é um fator de extrema importância a ser estudado e analisado. Após a quantificação da viabilidade celular para se dar início ao processo de compreensão quanto à interação material/ambiente é a análise do potencial de adesão celular que o material promove. Existem diversas análises para diferentes estudos, como, citometria de fluxo (Nakajima 2010), Fluorescência e fluorescência por marcadores imunológicos (Pires, 2010 e Zonari, 2010), Microscopia óptica (Guimarães, 2010), Microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Alves, 2006 e Soares, 2012). Esta avaliação quanto a resposta local do ambiente de implantação do material é um passo importante para outras análises futuras como avaliação de resposta *in vivo* local e sistêmica, também descrito e estabelecido na normativa.

**Tabela 2:** Testes de avaliação biológica para dispositivos médicos da normativa ISO 10993.

ISO 10993-1		TESTES DE AVALIAÇÃO INICIAL		EFEITOS BIOLÓGICOS (TOXICIDADES)								
CATEGORIZAÇÃO DO DISPOSITIVO MÉDICO				EFEITOS BIOLÓGICOS (TOXICIDADES)								
CATEGORIA	CONTATO	CLASSE POR TEMPO DE CONTATO	Natureza do contato com a pessoa-usuária	EFEITOS BIOLÓGICOS (TOXICIDADES)								
				CITOTOXICIDADE	SENSIBILIZAÇÃO DERMICA E/OU DE MUCOSAS	IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA, IRRITAÇÃO CUTÂNEA CUMULATIVA OU REATIVIDADE INTRA CUTÂNEA	TOXICIDADE AGUDA SISTÊMICA	TOXICIDADE SUBAGUDA E SUBCRÔNICA	GENOTOXICIDADE (TESTE AMES)	IMPLANTE	HEMOCOMPATIBILIDADE	
DISPOSITIVO DE SUPERFÍCIE	PELE	A		X	X	X						
		B		X	X	X						
		C		X	X	X						
DISPOSITIVO DE SUPERFÍCIE	MUCOSAS	A		X	X	X						
		B		X	X	X		X				
		C		X	X	X		X				
DISPOSITIVO DE SUPERFÍCIE	SUPERFÍCIE ROMPIDA OU COMPROMETIDA	A		X	X	X						
		B		X	X	X		X				
		C		X	X	X		X				
DISPOSITIVO INTRODUZIDO COM COMUNICAÇÃO EXTERNA	INDIRETO COM SANGUE	A		X	X	X						
		B		X	X	X		X				
		C		X	X	X		X				
DISPOSITIVO INTRODUZIDO COM COMUNICAÇÃO EXTERNA	TECIDO, OSSO OU DENTE	A		X	X	X						
		B		X	X	X		X				
		C		X	X	X		X				
DISPOSITIVO INTRODUZIDO COM COMUNICAÇÃO EXTERNA	INTERNO À CIRCULAÇÃO SANGÜÍNEA	A		X	X	X						
		B		X	X	X		X				
		C		X	X	X		X				
DISPOSITIVO DE IMPLANTE	TECIDO OU OSSO	A		X	X	X						
		B		X	X	X		X				
		C		X	X	X		X				
DISPOSITIVO DE IMPLANTE	SANGUE	A		X	X	X						
		B		X	X	X		X				
		C		X	X	X		X				

Fonte: Tradução da ISO 10993

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Local do experimento**

Os experimentos da fase 1, produção e avaliações físico-químicas das diferentes mantas de celulose, foram realizados na Universidade Estadual Paulista-Júlio de Mesquita Filho, no laboratório de biomateriais.

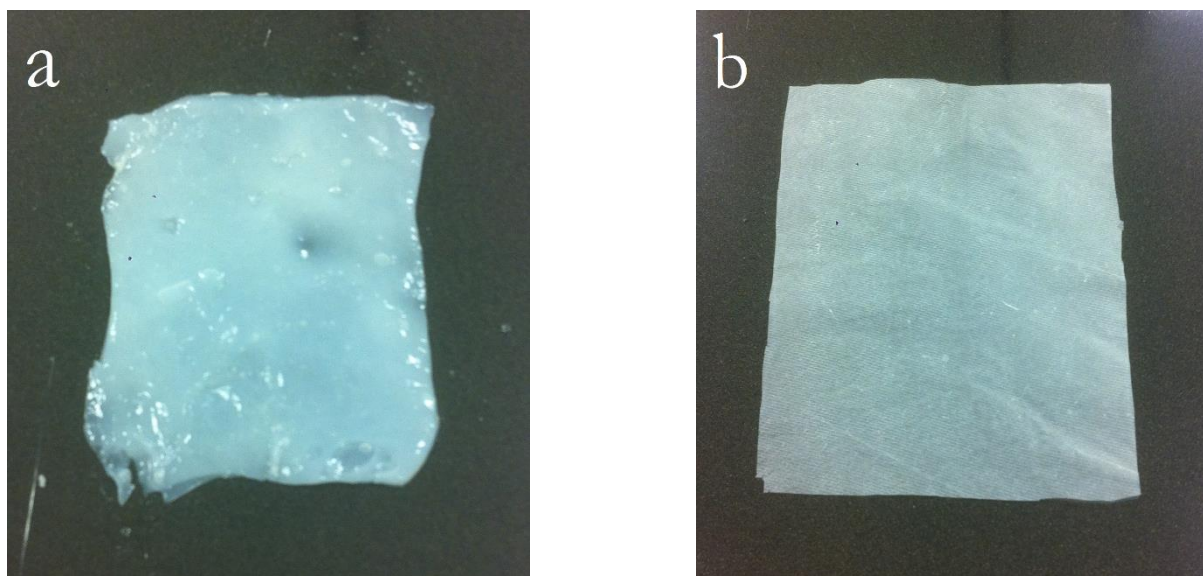
Os experimentos da fase 2, a avaliação da viabilidade celular das mantas recobertas com fosfatos de cálcio, foram realizados na Universidade Federal da Bahia-Instituto de Ciências e Saúde, Labimuno Anexo 1 e na Faculdade de Farmácia da Universidade Estadual Paulista.

### **4.2 Material experimental**

#### **4.2.1 Produção das mantas de celulose:**

As mantas de celulose bacteriana (CB) foram cedidas pela empresa Innovatec's situada na cidade de São Carlos no interior de São Paulo. O cultivo das bactérias *Gluconacetobacter xylinus* (cepa superprodutora) foi realizado em meio de cultura padronizado pela Innovatec's que utiliza um meio de cultura com chá verde para a produção da celulose por parte do microorganismo. A obtenção da membrana se ocorre com a produção de microfibras através da formação de um complexo de aspecto esbranquiçado e gelatinoso que forma uma película situada sobre a superfície do meio e a porção atmosférica acima deste, por ser um indivíduo aeróbio.

**Figura 3:** Condições utilizadas de celulose bacteriana. a) Hidrogel de celulose bacteriana. b) membrana de celulose bacteriana.



**Fonte: Próprio autor**

#### **4.2.2 Recobrimento biomimético com fosfatos de cálcio**

Foram confeccionados “*scaffolds*” a base de celulose bacteriana e fosfatos de cálcio de interesse biológico. A incorporação na matriz de celulose bacteriana foi feita pelo processo biomimético com solução de SBF (“*Simulated Body Fluid*”).

As soluções de SBF utilizadas para realização do processo biomimético foram preparadas seguindo à metodologia de Thomazini (2009), que estabeleceu algumas modificações a partir da solução biomimética criada por Abe et al. (1990), criando SBFs modificadas a fim de maximizar a formação de fases de fosfatos de cálcio distintas, tais como, TCP (Fosfatos tricálcio), OCP (fosfato octacalcico), ACP (Fosfato de cálcio amorfo), HA (Hidroxiapatita). Os reagentes são: cloreto de sódio, monohidrogênio carbonato de sódio, cloreto de potássio, monohidrogênio fosfato de potássio trihidratado, cloreto de magnésio hexahidratado, ácido clorídrico, cloreto de cálcio, sulfato de sódio, e trietanolamina (Tabela 4).

**Tabela 4:** Composição iônica do SBF padrão e SBFs modificadas (mmol.dm<sup>-3</sup>).

	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
<b>SBF 0</b> (padrão)	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	1,0	0,5	4,2
<b>SBF 1</b>	140,4	-	-	3,1	142,9	1,86	-	-
<b>SBF 2</b>	140,4	-	1,0	3,1	142,9	1,86	-	-
<b>SBF 3</b>	140,4	1,0	-	3,1	142,9	1,86	-	-
<b>SBF 4</b>	140,4	-	-	3,1	142,9	1,86	1,0	-
<b>SBF 5</b>	140,4	-	-	3,1	142,9	1,86	-	3,0
<b>SBF 6</b>	140,4	-	-	3,1	142,9	1,86	-	5,0

Para a realização do processo biomimético para incorporação de fosfatos de cálcio de interesse biológico, as mantas de celulose bacteriana receberam tratamento prévio com solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1 mol/L seguindo a metodologia de Hong et al. (2006).

As amostras foram imersas em solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1mol/L a uma temperatura de 37°C sem agitação por 72 horas, sendo que a solução de CaCl<sub>2</sub> foi trocada a cada 24 horas. Após o tratamento prévio com CaCl<sub>2</sub> as amostras foram divididas em 6 grupos para se obter: fase majoritária de interesse hidroxiapatita; fase majoritária de interesse ACP e fase majoritária de interesse OCP.

**Tabela 5:** Siglas adotadas para as condições de tratamento das membranas e hidrogéis/SBF.

Sigla	Tratamento	Sigla	Tratamento
<b>HC</b>	Hidrogel Controle	<b>MC</b>	Membrana Controle
<b>H0</b>	Hidrogel/SBF 0	<b>M0</b>	Membrana/SBF 0
<b>H1</b>	Hidrogel/SBF 1	<b>M1</b>	Membrana/SBF 1
<b>H2</b>	Hidrogel/SBF 2	<b>M2</b>	Membrana/SBF 2
<b>H3</b>	Hidrogel/SBF 3	<b>M3</b>	Membrana/SBF 3
<b>H4</b>	Hidrogel/SBF 4	<b>M4</b>	Membrana/SBF 4
<b>H5</b>	Hidrogel/SBF 5	<b>M5</b>	Membrana/SBF 5
<b>H6</b>	Hidrogel/SBF 6	<b>M6</b>	Membrana/SBF 6

O hidrogel de celulose bacteriana após processo de recobrimento biomimético foi seco em estufa 37°C e então reduzido a pequenas partículas em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido, a fim de apresentar características de dimensão mais interessantes para a ideia de preenchimento ósseo e para promover a viabilidade da sua caracterização.

#### **4.2.3 Caracterização dos materiais produzidos:**

##### **a) Difratomia de raios X – DRX**

Foram realizadas análises a fim de determinar a porção cristalina do *scaffold* produzido, utilizando-se o difratômetro de raios X, utilizando os parâmetros experimentais,  $2\theta = 4^\circ\text{-}80^\circ$ , passo de 0.05/1s.

##### **b) Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier**

Os grupos funcionais foram identificados a partir da Espectroscopia na região do infravermelho médio através da técnica de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), utilizando-se o ATR, do termo em inglês *Attenuated Total Reflectance* no intervalo de 400 a 4500  $\text{cm}^{-1}$  com o equipamento de Espectrofotometria, FTIR - VERTEX 70 / BRUKER com fonte, Laser de HeNe, detector DLaTGS.

##### **c) Microscopia Eletrônica de Varredura**

Para visualizar a superfície da amostra em escala microscópica em três dimensões foi utilizado o Microscópio de Varredura de Alta Resolução (FEG-MEV; JEOL modelo 7500F) Recobrimento com Carbono, 2kV, em aumentos de 500x, 10000x e 20000x.

##### **d) Análises Térmicas –**

São um conjunto de técnicas termoanalíticas onde são medidas as propriedades físicas, como, decomposição, capacidade de calor, mudanças de fase e reações calorimétricas de uma substância e/ou os seus produtos de acordo com a variação de temperatura controlada (Oréfice, 2006).

As análises utilizadas neste trabalho foram, análise Termogravimétrica (TGA) – Avaliou-se a mudança de massa de acordo com temperatura controlada, a calorimetria exploratória diferencial (DSC), para avaliar a diferença de fluxo de calor entre as amostras em especial comparação com a amostra controle. A análise termogravimétrica diferencial (DTG),

foi utilizada a fim de corroborar os valores obtidos através da TGA, analisando a variação de massa°C

Os parâmetros utilizados neste experimento foram, em atmosfera de Nitrogênio com aumento da temperatura em 10°C por minuto, na faixa de temperatura de 25°C a 650°C, com a massa de 10mg por amostra aproximadamente.

Para determinação da variação de massa a análise foi feita com o equipamento SDT Q600 TA Instruments e para avaliação do fluxo de energia a medição foi feita pelo DSC Q100 TA Instruments.

#### **4.2.4 Avaliação da viabilidade celular**

Foram utilizadas células pré-osteoblásticas murinas MC3T3-E1 Subclone 14 obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. O ensaio por redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazólio é utilizado para determinação da viabilidade e proliferação celular. O tetrazólio amarelo MTT é reduzido por células metabolicamente ativas, em parte pela ação de enzimas desidrogenases, para gerar equivalentes redutores como NADH e NADPH. O formazan púrpura resultante é diretamente proporcional ao número de células viáveis e é quantificado por meio de espectrofotometria (Husoy et al., 1993; Denizot e Lang, 1985; Mossman, 1983).

Preparou-se a suspensão celular na concentração de  $2,5 \times 10^4$  células/mL utilizando meio Alpha-MEM suplementado com 10% SFB e plaqueou-se 100 µL por poço (placa de 96 poços). Foram deixados poços sem células, apenas com meio de cultura, para ser o branco do ensaio, e os controles (negativo – sem tratamento, e positivo. Incubou-se a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 48h.

Adicionou-se a substância teste (celulose bacteriana em filme e em pó nas concentrações entre 250µg/mL- 0,9765625 µg/mL, com volume final de 100 µL por poço, diluída em meio de cultura sem soro. Incubou-se por 24 horas. Retirou-se o meio de cultura e lavou-se os poços com PBS (tampão fosfato salino) 1x estéril (100 µL por poço).

Adicionou-se 100 µL de solução de MTT a 0,5mg/mL a cada poço da placa e incubou-se ao abrigo da luz a 37°C por 5 horas. Após o período de incubação, removeu-se a solução de MTT dos poços e solubilizou-se os cristais roxos de formazana adicionando 100 µL de isopropanol acidificado por poço. Foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro

de placas a 570 nm. O equipamento foi programado para agitar as placas por 300 segundos (5 min) antes de cada leitura para solubilizar os cristais e homogeneizar a cor.

Determinou-se a média das replicatas de cada concentração e calculou-se a porcentagem de células viáveis em relação ao controle negativo através da fórmula abaixo:

$$\begin{array}{l} \% \text{ de células vivas} \\ \text{em relação} \\ \text{ao controle negativo} \end{array} = \frac{(\text{média absorvância do teste} - \text{média absorvância do branco})}{(\text{média absorvância do controle negativo} - \text{média absorvância do branco})} \times 100$$



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização do Hidrogel e membrana CB/fosfatos de cálcio

#### 5.1.1 Análise comparativa de CB/fosfatos de cálcio MEV

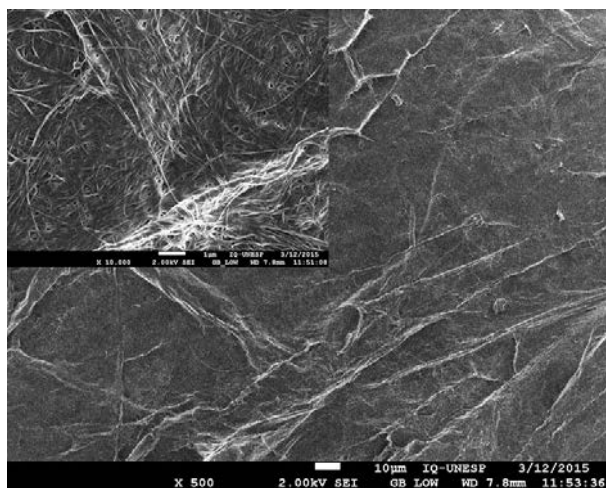
As figuras 4 a 7 correspondem a micografias de microscopia eletrônica de varredura do hidrogel e da membrana de celulose bacteriana ambas nas 7 condições de solução biomimética. A metodologia de formação de diferentes fases de CaP através das soluções biomiméticas de coprecipitação denominadas SBFs tem o seu princípio confirmado através das imagens a seguir que são vistas no aumento de 500x, e a visualização dos cristais e dedução das fases é possível no aumento de 10000x destas imagens.

O arranjo das microfibras de celulose bacteriana é visualizado na figura 4 através da fotomicrografia de MEV que ilustra a membrana que não passou pelo tratamento biomimético para formação de fosfato de cálcio. Nas amostras M0 a M6 é possível confirmar a deposição de fosfato de cálcio através da microscopia eletrônica de varredura que permite a visualização dos cristais e a identificação estimada do tipo de fosfato de cálcio formado. Nas amostras M0, M2, M5 e M6, é possível estimar a predominância da presença do fosfato de cálcio amorfo (ACP) através da identificação de pequenos grãos esféricos dos cristais de aspecto mais fechado. Já nas imagens de M1, M3, M4 e M6 é possível visualizar a morfologia da hidroxiapatita, com partículas que resultam em cristais semelhantes à forma de uma flor. (Thomazini, 2009)

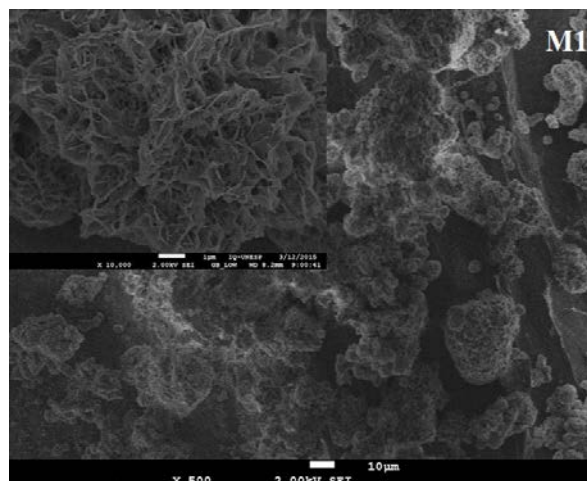
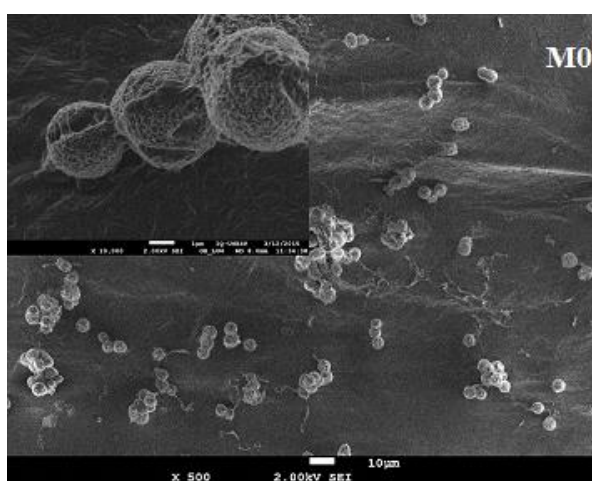
## a) MEMBRANA

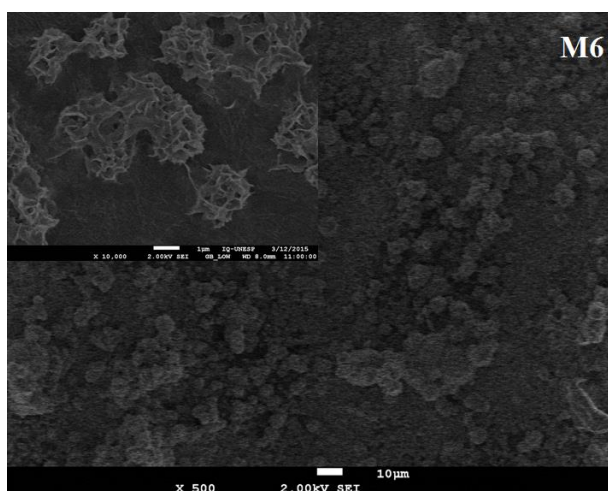
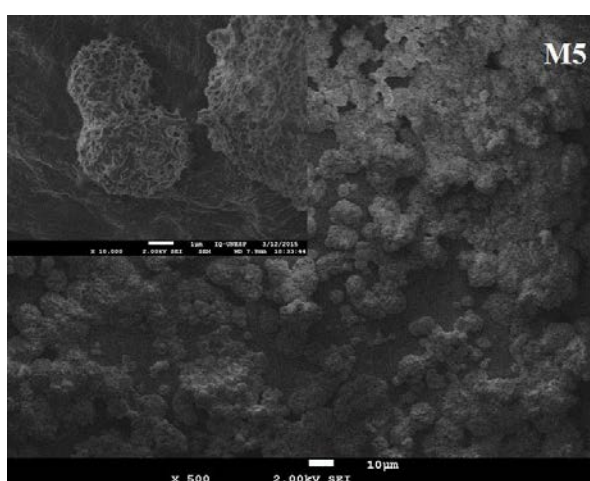
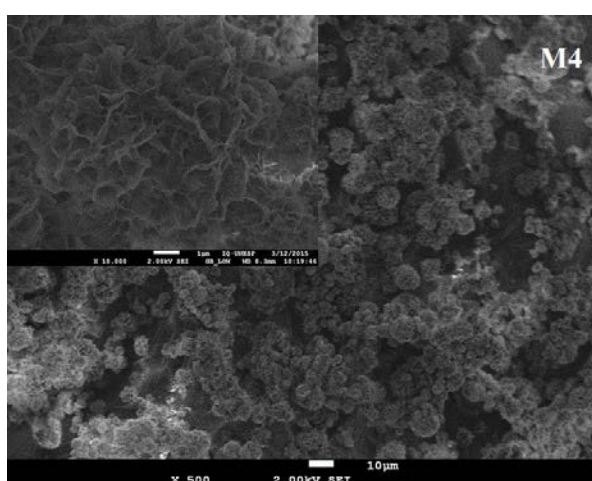
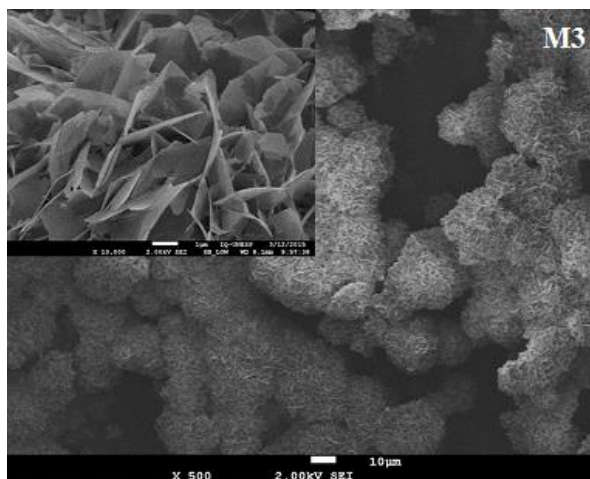
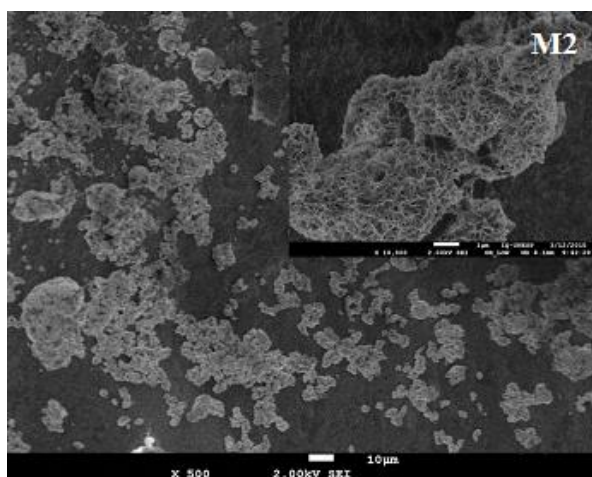
### Controle -

**Figura 4:** Micografia da membrana de celulose bacteriana sem tratamento nos aumentos de 500X e 10000X.



**Figura 5:** Fotomicografias das membranas de celulose bacteriana tratadas com solução biomimética SBF0 a SBF6, identificadas respectivamente como M0 a M6 com aumentos de 500x e 10000x. Evidência da formação de fosfatos de cálcio evidenciados pela formação de grãos na superfície.



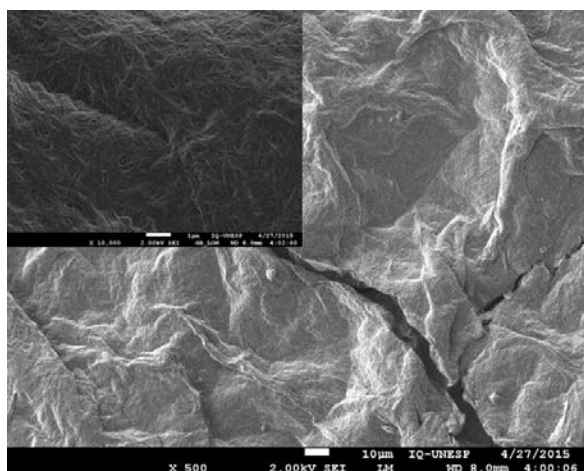


## b) Hidrogel

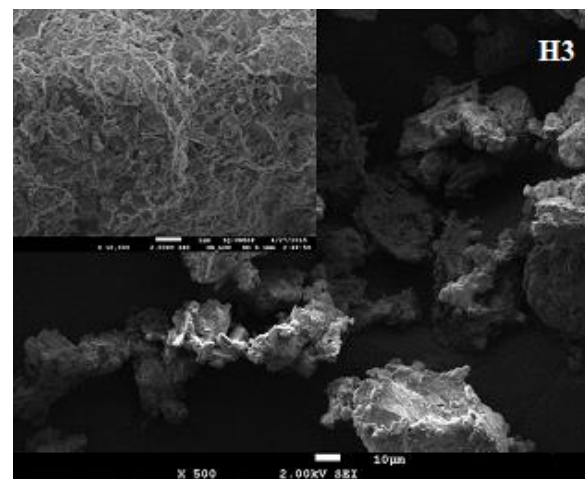
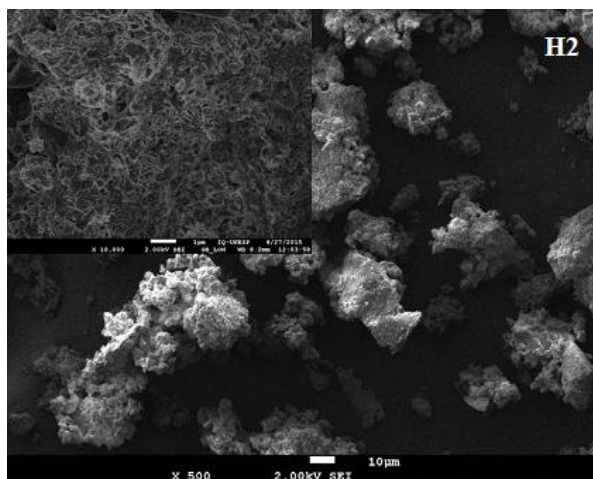
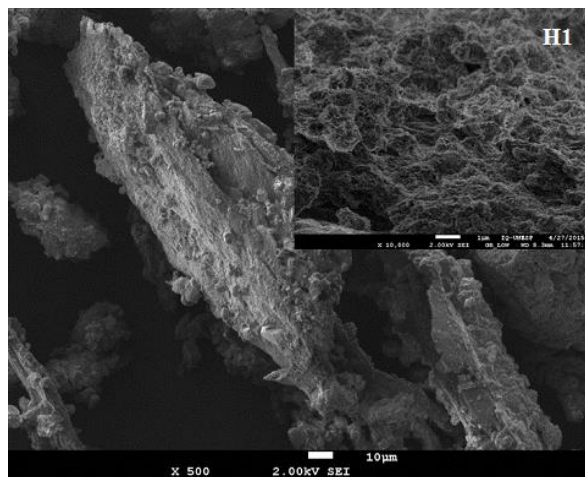
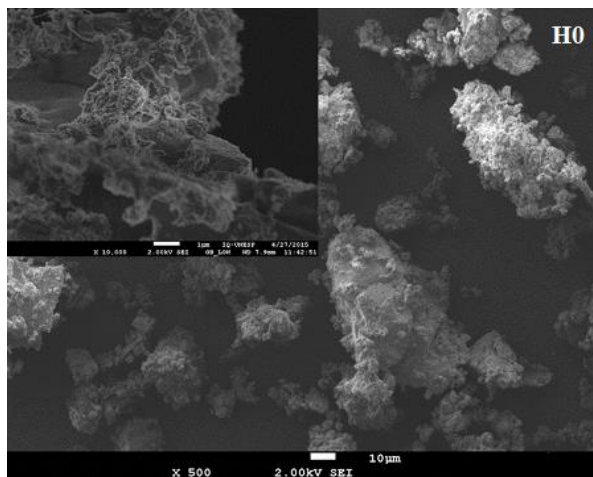
Apesar de a morfologia dos cristais não ter ficado tão evidente na microscopia eletrônica de varredura em todas as amostras ainda assim é possível estimar os fosfatos de cálcio formados na superfície da membrana. A figura 6 ilustra através da fotomicrografia de MEV a formação de microfibras de celulose bacteriana. Enquanto a figura 7 evidenciam a formação de diferentes tipos de fosfatos de cálcio formados na superfície do hidrogel de celulose bacteriana, dentre eles HA, encontrados em H0 e H4, ACP vistos em H2, H3, H5 e H6.

**Figura 6:** Micrografia do hidrogel de celulose bacteriana sem tratamento nos aumentos de 500X e 10000X.

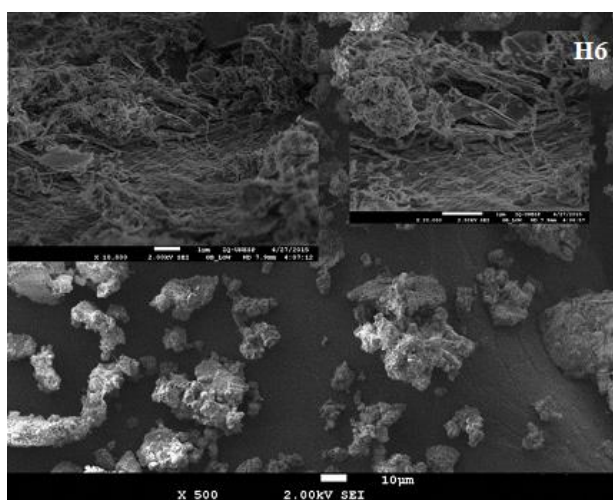
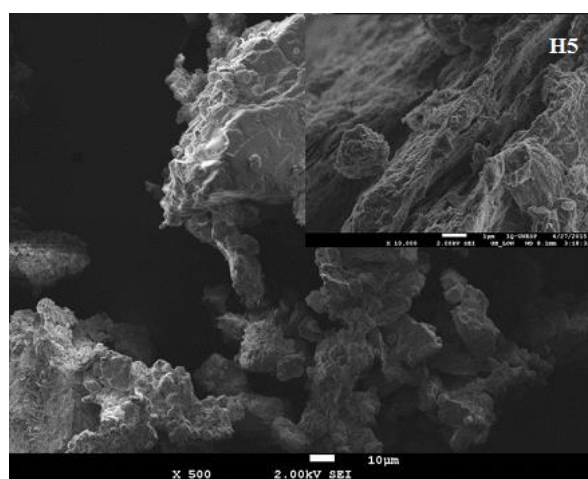
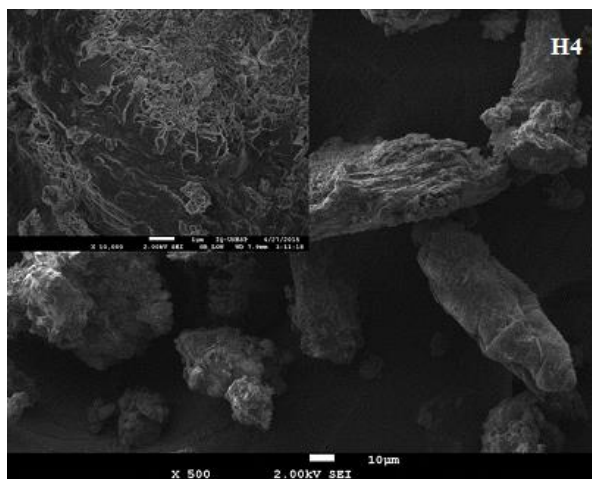
### CONTROLE -



**Figura 7:** Fotomicrografias dos hidrogéis de celulose bacteriana tratadas com solução biomimética com formação de fosfatos de cálcio, reduzido a pequenas partículas secas, nos aumentos de 500x e 10000x de H0 a H6 e aumentos 500, 10000 e 20000 em H6.





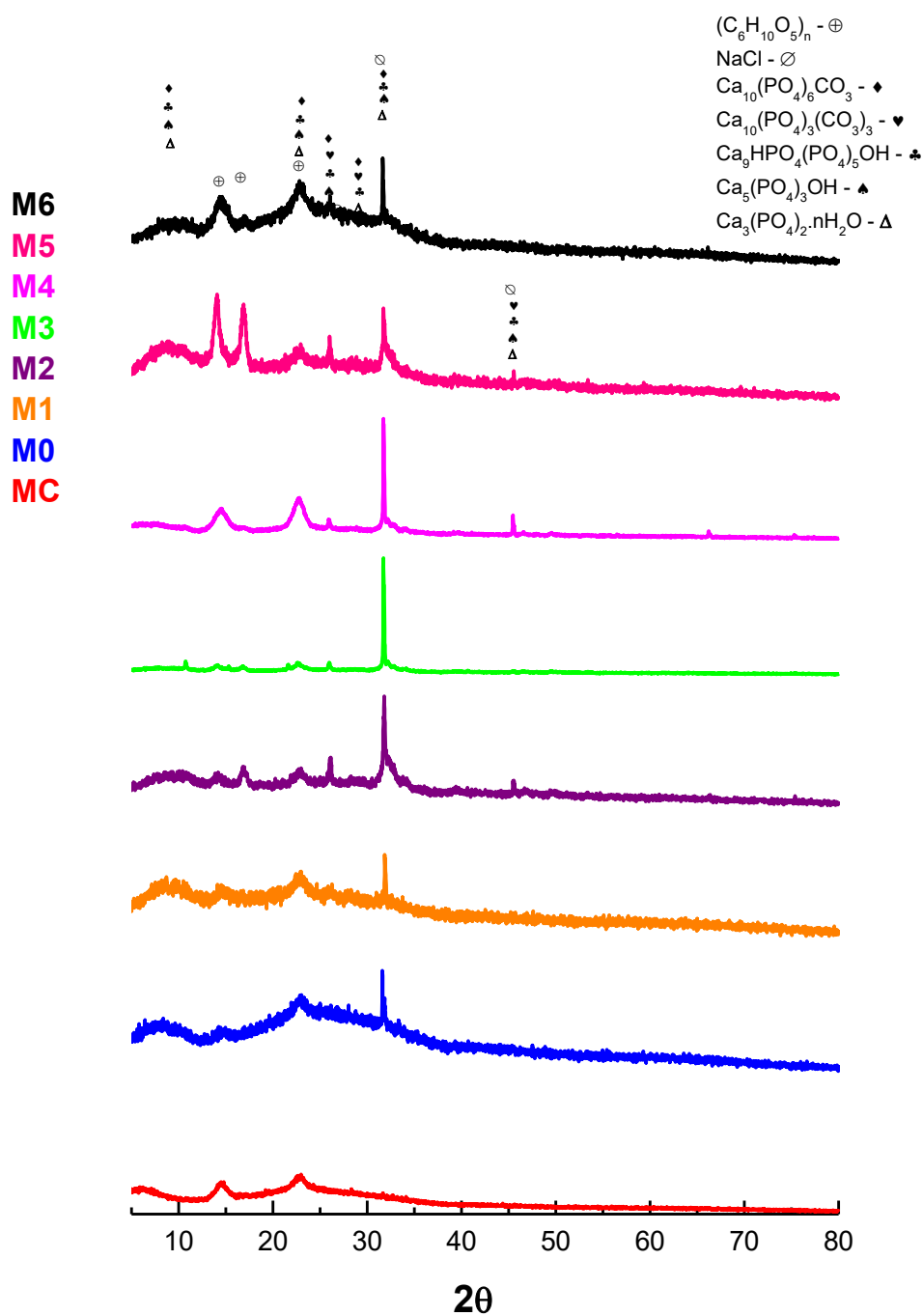


### 5.1.2 Análise comparativa de CB/fosfatos de cálcio - Raio X

Os padrões de difração de raios-X encontrados nas amostras, obtidos após o recobrimento por solução de SBF e SBFs modificadas (M0, M1, M2, M3, M4, M5 e M6 e MC) e da amostra controle estão representados na Figura X. Em comparação aos resultados obtidos com o processamento dos dados do Raio X com o hidrogel é mais enfática a formação dos picos, onde por quais podemos encontrar uma idéia do composto formado através do processo biomimético, os picos encontrados foram comparados com as fases de fosfatos de cálcio registradas no banco de dados conforme as fichas de referência JCPDS. Os picos correspondentes à celulose bacteriana (JCPDS #50-2241) são observados em 14.4°, 16.9° e 22.5°. No entanto foram confirmados apenas os picos em 14.4 e 16.9° em MC.

Apesar da pouca visualização das fases formadas em adsorção à membrana é possível identificar em análise do difratograma alguns fosfatos de cálcio nas membranas submetidas a depósito por solução de co-precipitação. Tais como, a hidroxiapatita (JCPDS # 89-4405) e hidroxiapatita deficiente em cálcio (JCPDS #46-905), passíveis de serem notadas em quase todas as amostras. Em contrapartida com os resultados do Raio X do hidrogel submetidos à teste a presença de ACP é muito menor em relação ao hidrogel.

**Figura 8:** Ensaio de difração de raio X de membrana de celulose bacteriana, amostras controle (MC) e sob tratamentos dos SBFs 0 a 6 (M0 a M6) com formação das fases de fosfatos de cálcio.



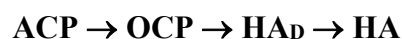
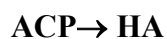


Os difratogramas encontrados após o recobrimento por solução de SBF e SBFs modificadas (H0, H1, H2, H3, H4, H5 e H6 e HC) e da amostra controle estão representados na Figura 9. Os picos correspondentes à celulose bacteriana (JCPDS #50-2241) são observados em 14.4°, 16.9° e 22.5°, com a presença de todos os picos na amostra HC. Entretanto nas amostras H0, H1, H2, H3, H4, H5 e H6, apenas os picos em 14.4° e 22.5° da celulose foram identificados.

Assim como na apresentação de picos da celulose bacteriana, foram observadas diferenças nas amostras com relação ao cloreto de sódio (NaCl) presente que apesar de estar presente em todas as amostras foi visto com variações. As amostras H0, H2 e H4 apresentam NaCl (JCPDS # 77-2064), estas também foram as amostras onde se observou menos formação de fases precursoras de Hidroxiapatita (H0 e H2), diferentemente dos picos presentes nas amostras H1 e H3 do cloreto de sódio (JCPDS #75-306) e P5 e P6 (JCPDS # 1-994).

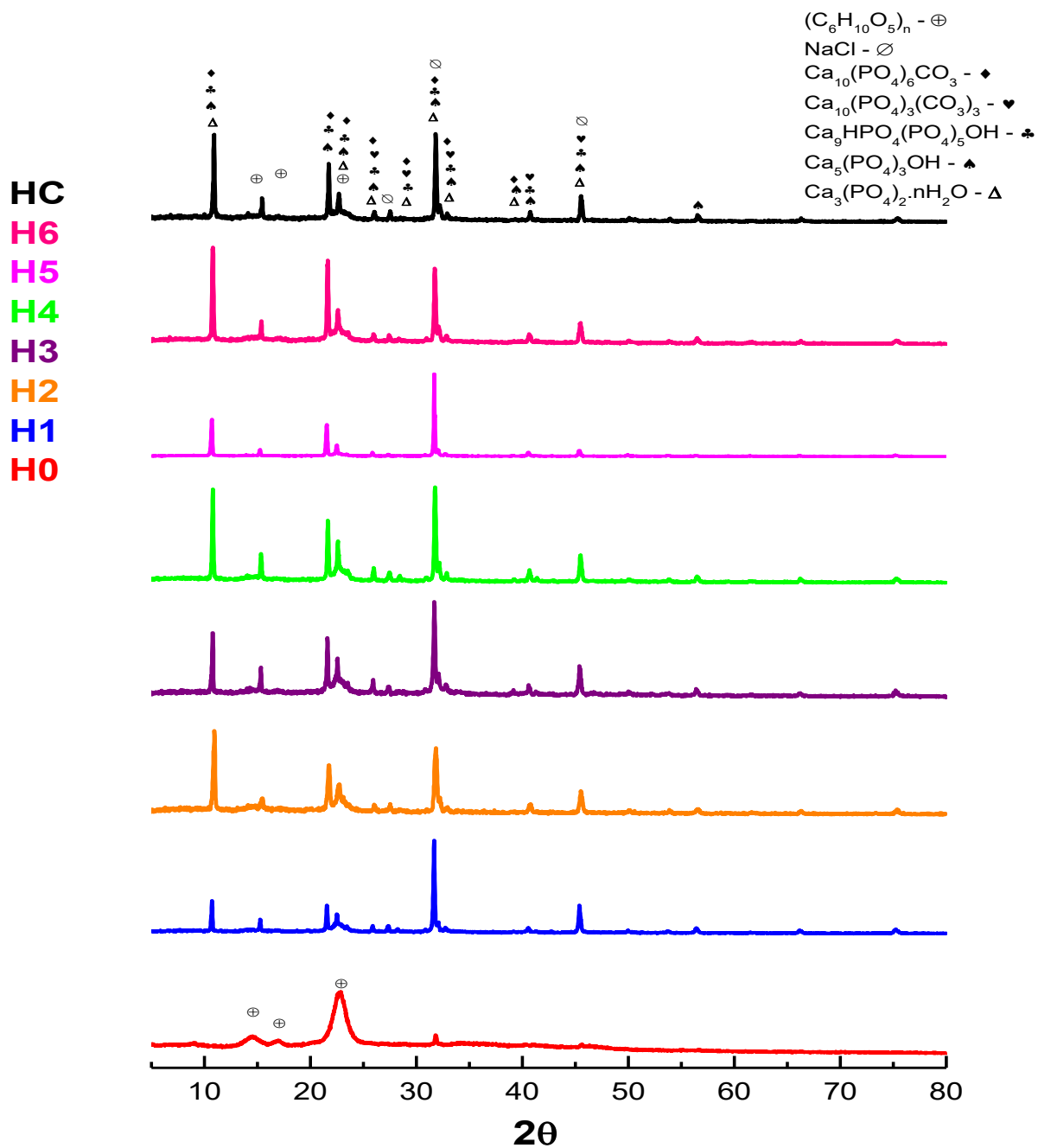
Verificou-se a presença de hidroxiapatita carbonatada tipo A (HA C A) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$ ) (JCPDS #35-180) nas condições que passaram pelo tratamento de SBF 0, 5 e 6, sendo o resultado de uma substituição no sítio OH da Hidroxiapatita (HA), pelo  $\text{CO}_3^{2-}$ .

A fase Fosfato de cálcio amorfo (ACP) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_2.n\text{H}_2\text{O}$ ) (JCPDS #18-303) foi observada, bem como a hidroxiapatita carbonatada tipo A, de H0 a H6, a presença de ACP é confirmada através da difração de raio X em H1, H2, H3, H5 e H6. Segundo Thomazini (2009), o ACP pode se transformar em outros fosfatos de cálcio, em soluções com pH alcalino ou neutro e em tecidos vivos durante a mineralização, podendo transformar-se diretamente em HA ou converter-se tendo como fases intermediárias octafosfato de cálcio (OCP) e a hidroxiapatita deficiente em cálcio, para então virar HA.



A HA deficiente em cálcio ( $\text{HA}_D$ ) ( $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ ) (JCPDS #46-905) também foi encontrada em todas as amostras testadas sob tratamento com SBF, assim como a Hidroxiapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) (JCPDS #89-4405), que estava presente em todas as condições com um alto número de picos compatíveis em H4 que também é evidente através da imagem de microscopia a formação de HA em H0 e H4, o que é explicado pela reação de formação da HA esquematizado acima, com passagem pelas diferentes fases também encontradas em todas as amostras testadas.

**Figura 9:** Análise de difração de raio X de hidrogel de celulose bacteriana, amostras controle (HC) e sob tratamentos dos SBFs 0 a 6 (H0 a H6) com as fases de fosfatos de cálcio formadas.



#### 5.1.4 Análise comparativa de CB/fosfatos de cálcio - FTIR

As figuras 10 e 11 apresentam os espectros de FTIR das condições controle de celulose bacteriana, sem modificação e dos *scaffolds* de celulose bacteriana/fosfatos de cálcio, após o recobrimento biomimético nas duas condições de celulose utilizadas, hidrogel e membrana.

Os números de onda entre 3200-3600  $\text{cm}^{-1}$  foi mantida apenas em M4. A diminuição da banda em M0, M5 e M6 e quase anulação em M1, M2 e M3 sugerem que estas 6 situações tiveram grande formação de Hidroxiapatita carbonatada tipo A e B considerando-se que a substituição do grupamento  $\text{OH}^-$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  por  $\text{CO}_3^{2-}$  ocorre na formação destes dois precursores da hidroxiapatita respectivamente. Sugerindo a formação de HA carbonatadas, pela variação de OH livre (Galaev et al., 1999; Aparecida et al, 2009).

Já o estiramento em 2700-3000  $\text{cm}^{-1}$ , é referente ao grupamento  $\gamma$  (CH) e (CH<sub>2</sub>) da cadeia de Celulose Bacteriana, é menos visível nas membranas, M1, M2 e M3 porém estando mais evidente nas amostras HC. A banda do grupo OH referente a estrutura da água, encontra-se localizada na região ~1600-1650  $\text{cm}^{-1}$ , novamente sendo mais acentuada na amostra controle HC e encontrada em M4, M5 e M6, caracterizando formação de Hidroxiapatita e hidroxipatita carbonatada. O estiramento característico na região 1500  $\text{cm}^{-1}$ , é correspondente ao grupamento  $\text{CO}_3^{2-}$  característico da molécula de hidroxiapatita carbonatada, podendo ser observada também em M4, M5 e M6 (Legeros, 2002). Observamos ainda, em todas as amostras o grupo CH da celulose na região 1400  $\text{cm}^{-1}$ . A banda localizada na região de 600  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  da HA. (Rigo et al., 2007)

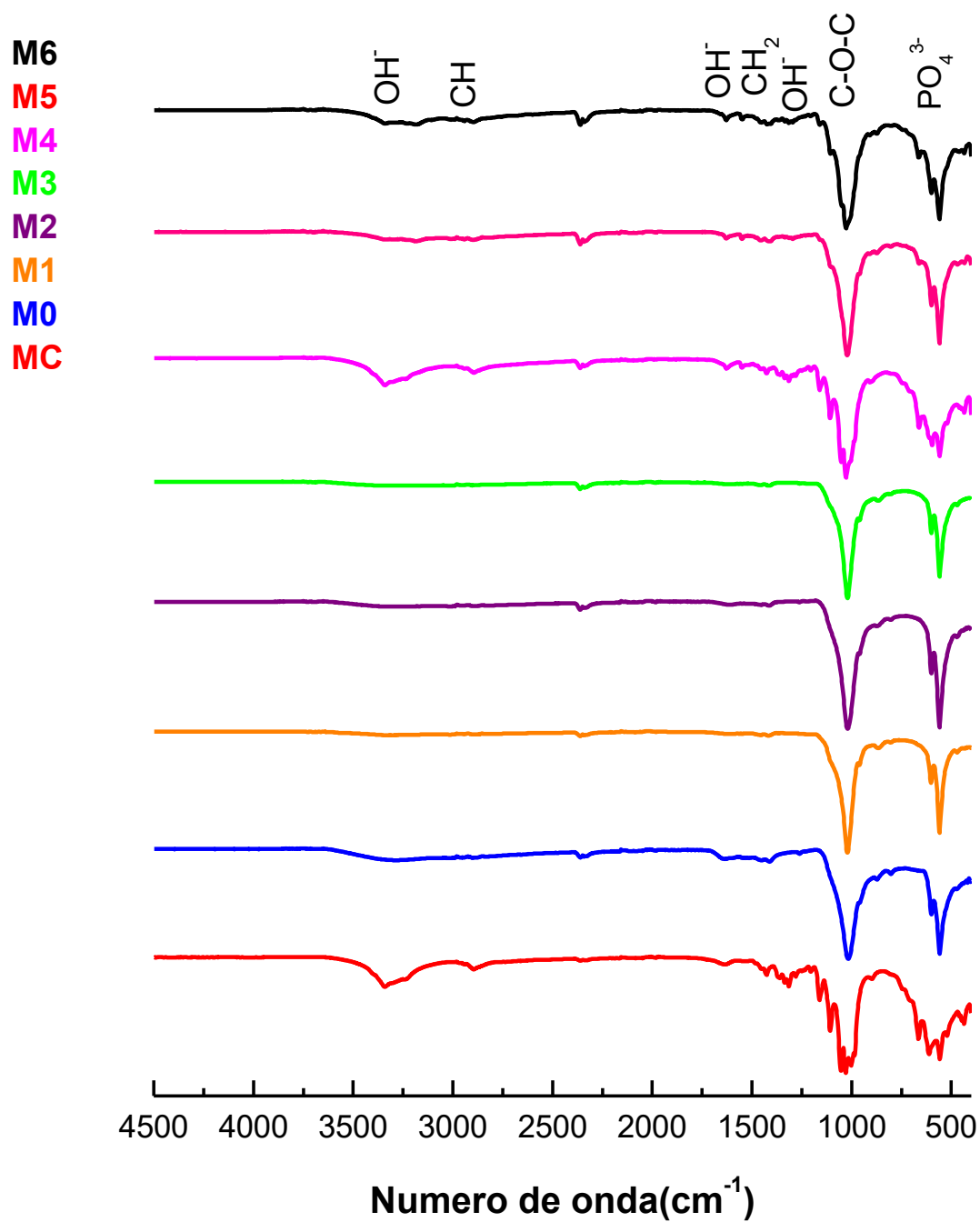
O comprimento de onda na região de 1162  $\text{cm}^{-1}$  corresponde aos glicosídeos, incluindo C–O–C, que é visto na celulose (Zhbanks, 1966; Olyveira et al. 2015).

A tabela 6 mostra as frequências de absorção no infravermelho características dos fosfatos de cálcio descobertas através de experimentos e da literatura, segundo Rodrigues (2012).

**Tabela 6** - Frequências de infravermelho encontradas no fosfato de cálcio.

<b>Modos de vibração (estiramento)</b>	<b>Número de ondas (cm<sup>-1</sup>)</b>
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	472, 497, 503, 560, 603, 800, 824, 875, 960-1100
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	730, 1188, 1370, 1400-1450
OH <sup>-</sup>	630, 700, 1640, 3200-3600
P = O	1212
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2000-2500

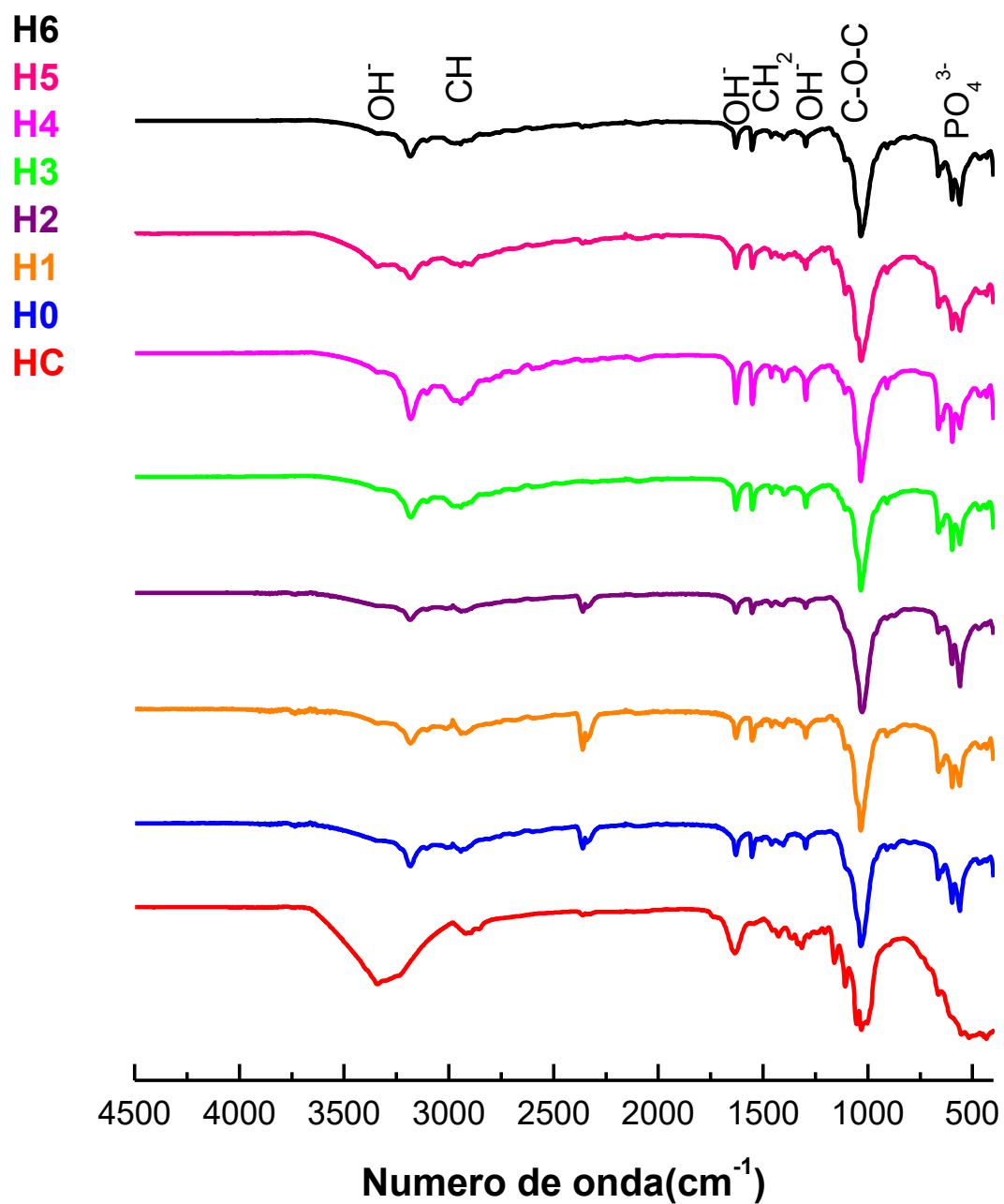
**Figura 10:** Espectros de membrana de celulose bacteriana sem tratamento biomimético (MC) e com tratamento biomimético por SBF modificadas (M0 a M6).



Ao observar o hidrogel nota-se que a banda correspondente ao grupamento hidroxila localizado em  $3200-3600\text{cm}^{-1}$  apresentou forte mudança conformacional em H4, H5 e H6 e por considerável redução em H0, H1, H2, H3 e H4, evidenciando um perfil semelhante ao encontrado nas membranas, sugerindo também formação de hidroxiapatita carbonatada visualizada também através das imagens de MEV e gráficos de DRX. O estiramento em  $2700-3000\text{cm}^{-1}$  referente ao grupamento  $\gamma$  (CH) e (CH<sub>2</sub>) da cadeia de Celulose Bacteriana está presente em todas as amostras em hidrogel porém também apresentando uma mudança conformacional suave em M1, M2 e M4 com relação ao controle representado na cor vermelha. No entanto a banda do grupo OH referente a estrutura da água, encontra-se localizada na região  $\sim 1600-1650\text{cm}^{-1}$ , apresentou fortes diferenças com relação a HC mas ainda assim é encontrada em todos os hidrogéis, e é observada de forma muito semelhante em todas as amostras de hidrogel com excessão do H4.

O estiramento característico na região  $1500\text{cm}^{-1}$ , é correspondente ao grupamento  $\text{CO}_3^{2-}$  característico da molécula de hidroxiapatita carbonatada do tipo A, onde um grupamento  $\text{PO}_4^{3-}$  é substituído por um grupo  $\text{CO}_3^{2-}$ , podendo ser observada em H0, H1, H2, H3, H4, H5 e H6 (Legeros, 2002). Observamos ainda, em todas as amostras o grupo CH da celulose na região  $1400\text{cm}^{-1}$ . A banda localizada na região de  $600\text{cm}^{-1}$  corresponde ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  da HA. (Rigo et al., 2007)

**Figura 11:** Espectros de CB hidrogel sem tratamento biomimético (HC) e com tratamento biomimético (H0 a H6).



### 5.1.5 Análise comparativa de análises térmicas de CB/fosfatos de cálcio

Na figura 12 observa-se uma perda de massa leve na ordem de 0,1% aproximadamente que se aplica a perda de água fisicamente adsorvida no compósito tanto na membrana como no hidrogel em todas as condições apresentadas, com exceção da HC que apresentou perda de massa de 0,2% nesta faixa de temperatura de 25-200°C, considerando-se que a escala vai de 0 a 1,1%. Esta mudança também é vista nos picos formados através da análise de calorimetria exploratória diferencial e DTG, nas imagens “a” e “b” da figura 14 (Capanema, 2014; da Silva 2012)

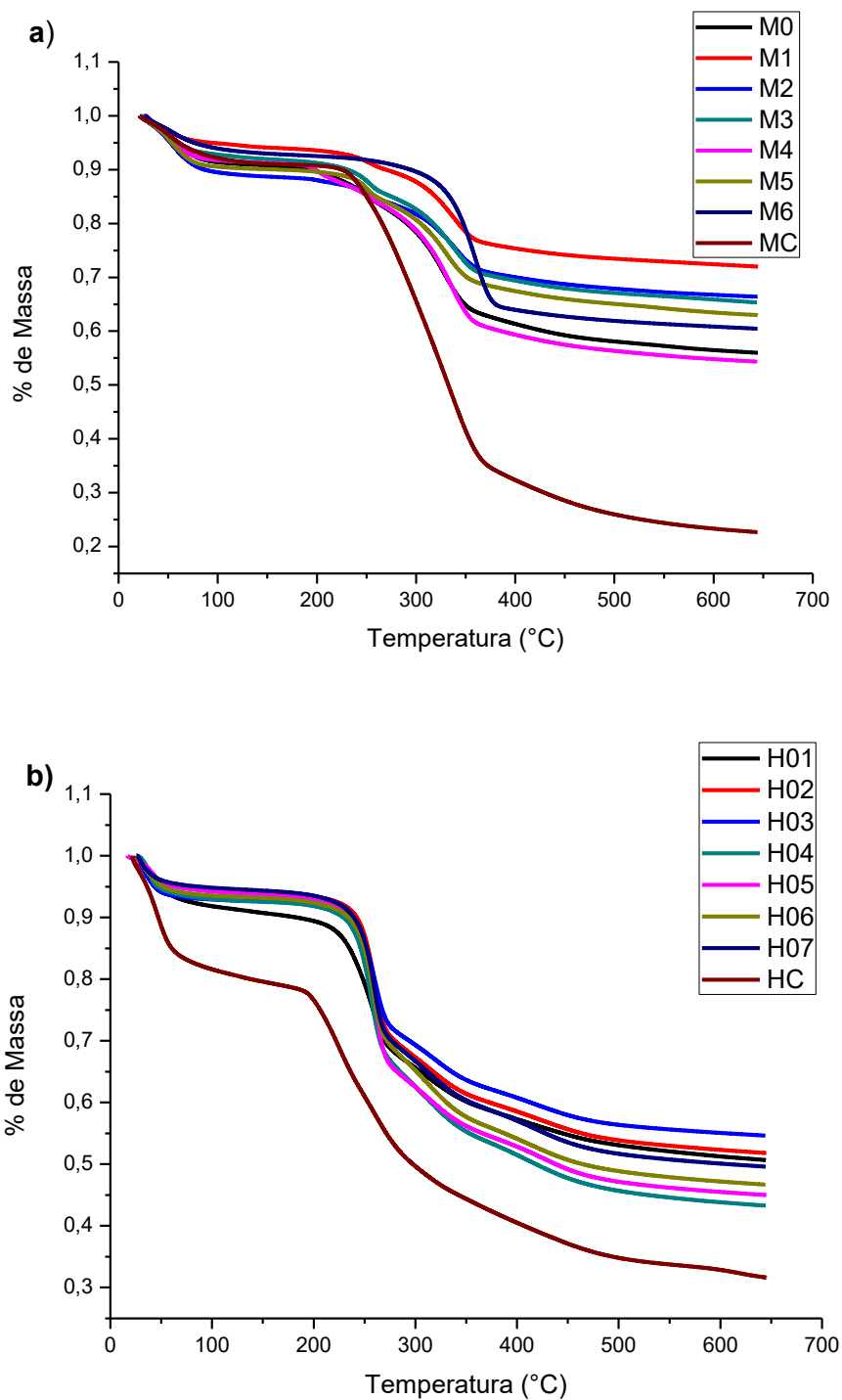
Nota-se uma diminuição da massa mais significativa nas amostras controle do hidrogel e da membrana nas temperaturas de 250-400°C, totalizando a perda de massa de 100%. Esta faixa de temperatura proporciona a quebra das cadeias glicosídicas e a perda da água quimicamente adsorvida. No entanto nas amostras que passaram pelos tratamentos com os SBFs nota-se que o declínio da curva não foi tão acentuado e a perda de massa foi menor. (Ciolacu, et al. 2011)

Ao observar o perfil da curva após esta temperatura, no caso da membrana é possível perceber que a perda de massa se mantém de forma gradativa, mas em pequenas proporções, já no hidrogel é possível perceber que a proporção da perda de massa é maior a partir do ponto de 400°C, indicando maior desidroxilação do CaP (da Silva, 2012). É possível corroborar estas constatações e estas variações de temperatura através das figuras 13 e 14 que apresentam os gráficos de DSC e DTG que mostram de forma mais clara e objetiva a faixa de temperatura e as mudanças ocorridas nas amostras testadas.



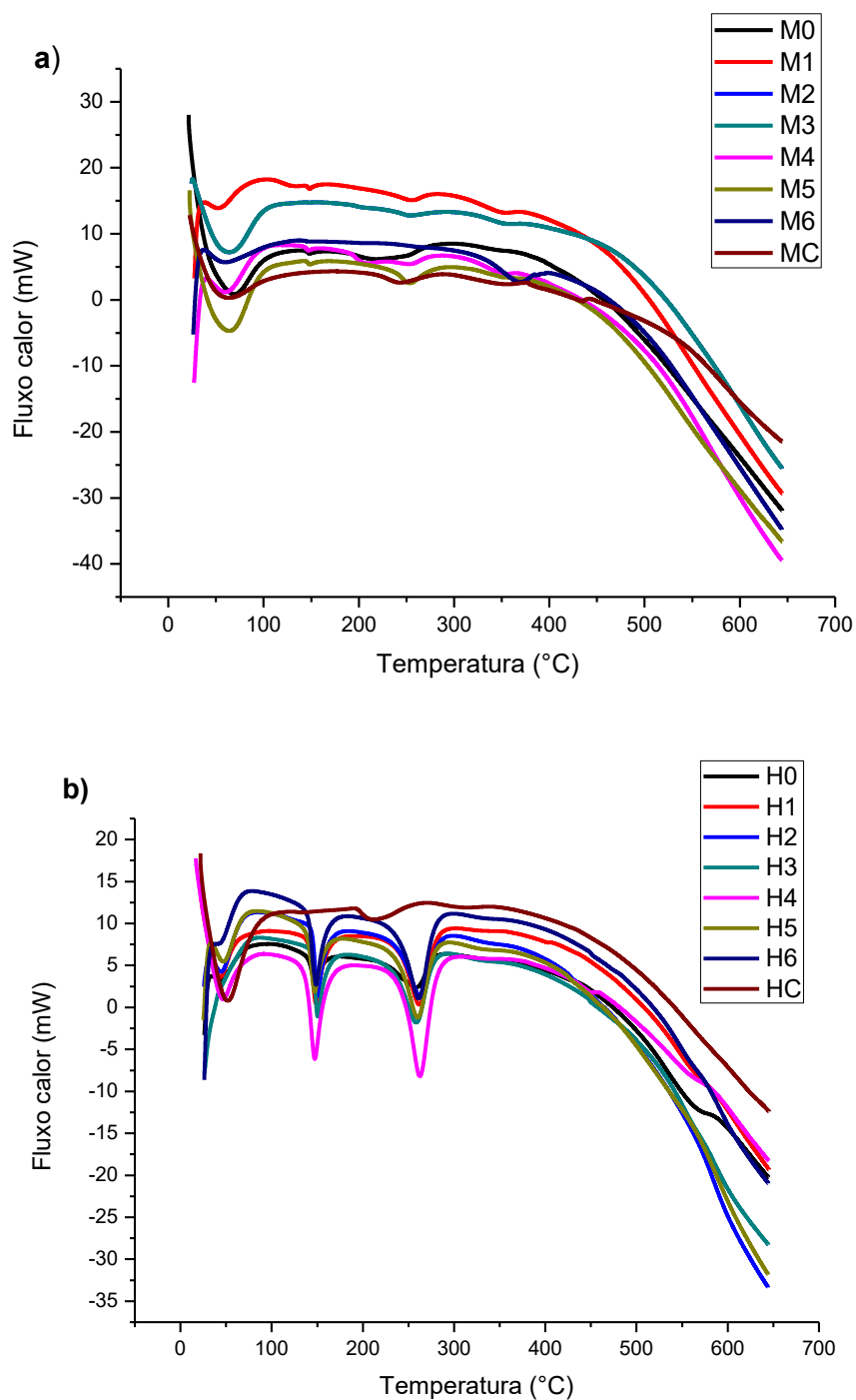
### 5.1.5.1 TGA

**Figura 12:** Análise termogravimétrica de a) membrana de CB e b) hidrogel de celulose bacteriana sem tratamento biomimético (MC e HC) e com tratamento biomimético por SBF modificadas. (M0 a M6 e H0 a H6).



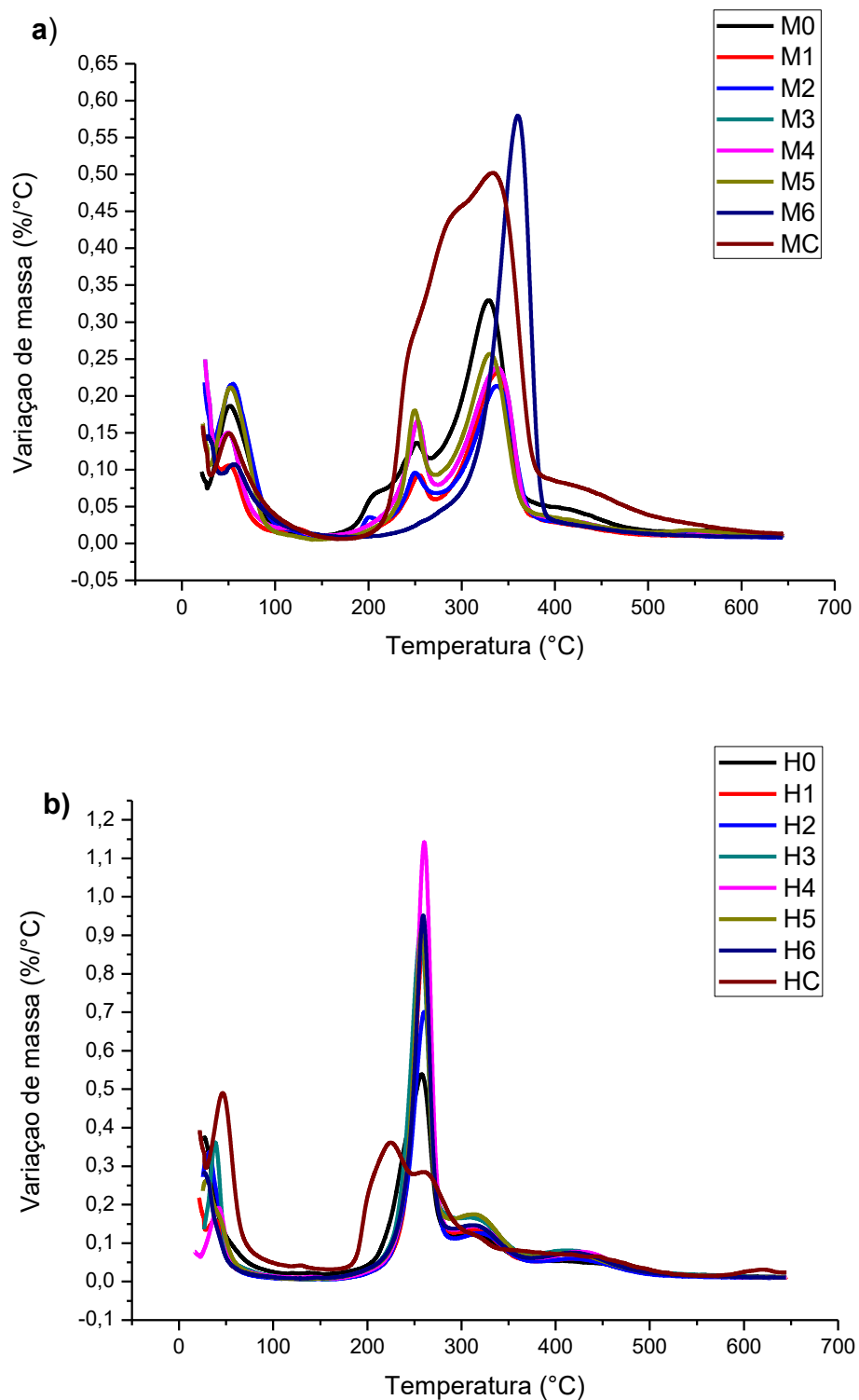
### 5.1.5.2 DSC:

**Figura 13:** Calorimetria exploratória diferencial da membrana (a) e do hidrogel (b) de celulose bacteriana sem tratamento biomimético e com tratamento biomimético por SBF modificadas.



### 5.1.5.3 DTG:

**Figura 14:** Termogravimetria diferencial de a) membrana de CB e b) hidrogel de celulose bacteriana sem tratamento biomimético (MC e HC) e com tratamento biomimético por SBF modificadas. (M0 a M6 e H0 a H6).



## 5.2 Testes biológicos

Os testes biológicos foram realizados apenas nos hidrogéis recobertos por fosfatos de cálcio, todas as soluções (SBF e SBFs modificadas, 0 a 6) foram usadas com o hidrogel, representadas por H0 a H6. A adesão dos fosfatos de cálcio ao hidrogel apresentou um resultado esperado com base em outros estudos de citotoxicidade, adesão e proliferação *in vitro* com uso de celulose bacteriana que evidenciam resultados similares (Taokaew et al., 2014; Kim et al., 2013; Favi et al., 2013).

**Figura 15:** Fotografia da cultura de células MC3T3-e1, nos diferentes aumentos 10x, 20x, e 40x, antes da realização dos testes de viabilidade celular.



### 5.2.1 Avaliação da viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi feito a partir do método de redução do MTT. Neste teste as células com amostras de hidrogel/fosfato de cálcio e membranas/fosfatos de cálcio foram cultivadas em placas de poliestireno. O poço vazio (com meio de cultura sem células), foi utilizado como Branco, o poço sem hidrogel, com as células foi considerado o controle negativo (CN), as amostras sem recobrimento biomimético (HC e MC), foram utilizadas para avaliar a diferença de viabilidade das células em relação aos SBFs e as outras 7 membranas (P0/SBF0; P1/SBF1; P2/SBF2; P3/SBF3; P4/SBF4; P5/SBF5 e P6/SBF6), foram os *scaffolds* testados.

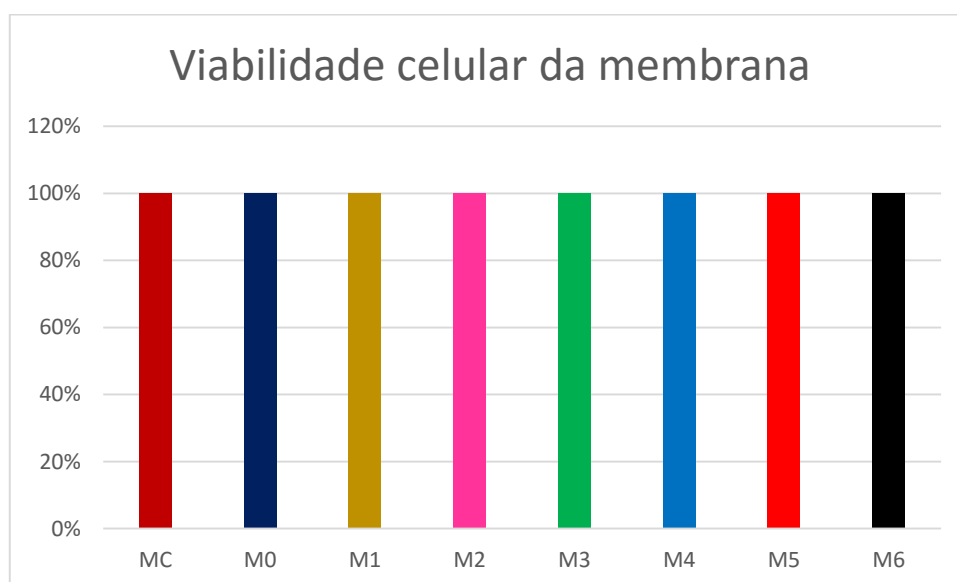
As figuras 16 e 17 e as tabelas 7 e 8, ilustram os resultados dos testes de viabilidade celular. Todos os *scaffolds* foram cultivados por 24 horas, antes de ser submetido a mais 4 horas de incubação do teste e não apresentaram citotoxicidade neste período para as células, a ausência de morte celular no tempo de cultivo evidencia que a celulose bacteriana nas condições



**Tabela 8** - Percentual de células vivas após contato com membrana de celulose bacteriana com tratamentos de SBF (M0 – M6) e sem tratamento (MC).

MC	100%
M0	100%
M1	100%
M2	100%
M3	100%
M4	100%
M5	100%
M6	100%

**Figura 17** - Percentual de células vivas após contato com membrana de celulose bacteriana com tratamentos de SBF (M0 – M6) e sem tratamento (MC).



## 6. CONCLUSÕES

A partir do uso de SBFs modificadas foi possível preparar compósitos de celulose bacteriana e fosfatos de cálcio através do processo de coprecipitação utilizando-se o SBF estabelecido por Thomazini (2009). Observou-se uma maior formação de fosfatos de cálcio em diferentes fases pelos SBFs modificados quando comparados ao SBF padrão (SBF 0). Nos SBFs 1, 2, 3, 4, 5, 6 foram observadas fases precursoras da Hidroxiapatita e importantes no processo de formação de tecido ósseo, como, apatita carbonatada tipo A, ACP, Hidroxiapatita deficiente em cálcio e Hidroxiapatita. A adesão destes CaP não inibiu completamente as características da celulose, que são evidenciadas nos FTIR, DRX, análises térmicas e é possível ser vista nas micografias de MEV, foram também notadas diferenças entre as diferentes condições testadas, o hidrogel e a membrana que apresentaram variações quando comparadas nas técnicas de caracterização utilizadas. Os *scaffolds* de celulose bacteriana/fosfato de cálcio obtidos não apresentaram citotoxicidade em nenhuma das condições.

## REFERÊNCIAS

- ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 1, p. 233-238, 1990.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- ALVES, S. de C. F. **Avaliação “in vitro” da adesão e proliferação de osteoblastos sobre implantes osseointegráveis com superfície usinada (TITAMAX liso®)**. 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic, Campinas, 2006.
- ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e fisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 35, n. 2, p. 191-198, 2006.
- AOKI, H. **Science and medical applications of hydroxyapatite**. Tokio: JAAS, 1991.
- AOUADA, F. A. et al. Correlação entre parâmetros da cinética de intumescimento com características estruturais e hidrofílicas de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose. **Química Nova**, v. 32, p. 1482-1490, 2009.
- APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V. L.; GUASTALDI, A. C. Biomimetic apatite formation on ultra-high molecular weight polyethylene using modified biomimetic solution. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, p. 1215-1222, 2009.
- APARECIDA, A. H. et al. Estudo da influência dos íons  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$  e  $CO_3^{2-}$  na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (acp) e conversão a fosfato octacálcico (ocp). **Química Nova**, v. 30, p. 892-896, 2007.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p. 27-34, 2007.
- BARUD, H. da S. **Novos materiais multifuncionais baseado em celulose bacteriana**. 2010. 172 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- BAXTER, L. C. et al. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. **European Cells and Materials**, v. 4, p. 1-17, 2002.
- BORGES, C. D. et al. Caracterização de biopolímeros produzidos por *Beijerinckia* sp. 7070 em diferentes tempos de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 327-332, 2004.
- BORSCHIVER, S.; LUIZ, F. M.; ALMEIDA, T. R. Monitoramento tecnológico e mercadológico de biopolímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, p. 256-261, 2008.



BOSCHI, A. O. O que é necessário para que um material possa ser considerado um biomaterial? In: CONGRESSO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE METALURGIA, 50, 1995, São Pedro. **Anais...** São Paulo: ABM, 1996. v. 6, p. 43-53.

CACCAVO, D. et al. Understanding the adhesion phenomena in carbohydrate-hydrogel-based systems: water up-take, swelling and elastic detachment. **Carbohydrate Polymer**, v. 131, p. 41-49, 2015.

CAPANEMA, N. S. V. **Síntese e caracterização de biocerâmicas à base de fosfato de cálcio modificada com nióbio**. 2014. 163 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e Minas) - Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

CHAWLA, P. R. et al. Microbial cellulose: fermentative production and applications. **Food Technology Biotechnology**, v. 47, p. 107-124, 2009.

CIOLACU, D; CIOLACU, F; POPA, V. I. Amorphous cellulose: structure and characterization. **Cellulose Chemistry and Technology**, Bucharest, v. 45, p. 13-21, 2011.

COSTA, A. C. F. M. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 4.3, p. 29-38, 2009.

CZAJA, C. et al. Microbial cellulose: the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, p. 145-151, 2006.

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

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271-277, 1985.

FAVI, P. M. et al. Cell proliferation, viability, and in vitro differentiation of equine mesenchymal stem cells seeded on bacterial cellulose hydrogel scaffolds. **Materials Science and Engineering**, v. 33, p. 1935-1944, 2013.

GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. 'Smart' polymers and what they could do in biotechnology and medicine. **Trends Biotechnology**, v. 17, n. 8, p. 335-340, 1999.

GARDNER, E.; GRAY, D. J.; O'RAHILLY, R. **Anatomia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1975.

GUIMARÃES, M. B. **Avaliação da influência de diferentes superfícies na adesão e proliferação de osteoblastos humanos**. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

HELMUS, M. N.; TWEDEN, E. Materials section. In: WISE, D. L. (Ed.). **Encyclopedic handbook of biomaterial and bioengineering**, New York: Marcel Dekker, 1995. v. 1, p. 27-59.

HENN, J. D. **Bioquímica do tecido ósseo**. 2010. 19 f. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/osso\\_henn.pdf](http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/osso_henn.pdf)>. Acesso em: 01 set. 2015.

HONG, L. et al. Hydroxiapatite/bacterial cellulose composites synthesized via biomimetic route. **Materials Letters**, v. 60, p. 1710-1713, 2006.

HUSOY T, SYVERSEN T, JENSSENT J. Comparisons of four in vitro cytotoxicity tests: the MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. **Toxicity in Vitro**, v. 7, p. 140-154, 1993.

JUDAS, F. et al. **Estrutura e dinâmica do tecido ósseo**. Coimbra, 2012. Disponível em: <<http://rihuc.huc.min-saude.pt/bitstream/10400.4/1346/1/TECIDO%20%C3%93SSEO%20.pdf>>. Acesso: em 01 set. 2015.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e biologia celular**: uma introdução à patologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

KIM, G.-D. et al. Evaluation of immunoreactivity of in vitro and in vivo models against bacterial synthesized cellulose to be used as a prosthetic biomaterial. **BioChip Journal**, v. 7, p. 201-209, 2013.

LEAL, C. V. **Desenvolvimento e avaliação in vitro de um cimento de fosfato de cálcio**. 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 395, p. 81-98, 2002.

MARZOLA, C.; PASTORI, C. M. Enxertos em reconstruções de maxilas atroficas. **Revista Odontologia**, Bauru, v. 4, p. 298-309, 2006.

MOORE, K. L. **Anatomia orientada para a clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAKAJIMA, K. **Avaliação do ciclo celular de células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea de camundongos submetidos a desnutrição protéica**. 2010. 172 f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

NEVILLE, B. et al. **Patologia oral e maxilofacial**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

OLIVEIRA, L. S. de A. F. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, p. 37-44, 2010.

OLIVEIRA, M. J. A. et al. Obtenção e caracterização de membranas de hidrogéis de PVAL/PVP/ácido cítrico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 10, 2009, Foz do Iguacu, Paraná. **Anais...** [S.l:s.n.], 2010. CD-ROM.

OLIVEIRA, G. M. et al. Hydrogel bacterial cellulose behavior with stem cells. **Advanced Science, Engineering and Medicine**, v. 7, p. 383-397, 2015.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. de M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

PIRES, G. **Biomateriais derivados de quitosana e hidroxiapatita com potencial para preenchimento ósseo**. 2010. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annual Reviews Biomedical Engineering**, v. 6, p. 41-75, 2004.

RECOUVREUX, D. de O. S. **Desenvolvimento de novos biomateriais baseados em celulose bacteriana para aplicações biomédicas e de engenharia de tecidos**. 2008. 124 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

RIGO, E. C. da S.; GEHRKE, S. A.; CARBONARI, M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. **Revista Dental Press Periodontia Implantologia**, Maringá, v. 1, p. 39-50, 2007.

RODRIGUES, L. R. **Scaffolds baseados em nanopartículas de fosfatos de cálcio para engenharia tecidual óssea**. 2012. 169 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

SANTOS, K. S. **Biomateriais na regeneração óssea**. 2011. 40 f. Seminário apresentado junto a disciplina Seminários Aplicados. Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011. Disponível em:  
<[https://portais.ufg.br/up/67/o/semi2011\\_Kesia\\_Sousa\\_2c.pdf](https://portais.ufg.br/up/67/o/semi2011_Kesia_Sousa_2c.pdf)>. Acesso em 01 set. 2015.

SILVA, D. F. da **Síntese e caracterização de biomateriais de fosfatos de cálcio a partir de conchas calcárias fossilizadas**. 2012. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2012.

SOARES, R. D. **Análise in vitro da adesão e proliferação de osteoblastos sobre a superfície de zircônia tratada por laser de Er, Cr:YSGG (*Erbium-chromium: Yttrium, Scandium, Gallium, Garnet*)**. 2012. 44 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Guarulhos, Guarulhos, 2012.

THOMAZINI, A. H. A. **Desenvolvimento de estruturas porosas de polietileno de ultra alto peso molecular (PEUAPM) recobertas com apatitas para substituição e regeneração óssea**. 2009. 142 f. Tese. (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

WAN, Y. Z. et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 66, p. 1825-1832, 2006.

ZHBANKO, R. G. Model cellulose compounds. Unmodified cellulose. In: \_\_\_\_\_. **Infrared spectra of cellulose and its derivatives**. Nova York: Springer, 1966. Chap. 2, p. 325-333, 1966.

ZONARI, A. A. C. **Avaliação da adesão, proliferação e diferenciação endotelial de células-tronco humanas cultivadas em nanofibras de polihidroxibutirato**. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.