



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
MATERIAIS**

**EDEN BATISTA DUARTE**

**PRODUÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS DE CELULOSE BACTERIANA E  
HIDROXIAPATITA COMO ROTA PARA VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS  
AGROINDUSTRIAS**

**FORTALEZA**

**2014**

**EDEN BATISTA DUARTE**

**PRODUÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS DE CELULOSE BACTERIANA E  
HIDROXIAPATITA COMO ROTA PARA VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS  
AGROINDUSTRIAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Materiais da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Engenharia e Ciências de Materiais. Área de Concentração: Propriedades Físicas e Mecânicas dos Materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa  
Coorientadora: Dra. Morsyleide de Freitas Rosa

**FORTALEZA  
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia - BPGE

---

D871p Duarte, Eden Batista.  
Produção de nanocompósitos de celulose bacteriana e hidroxiapatita como rota para  
valorização de resíduos agroindustriais / Eden Batista Duarte. – 2014.  
117 f. : il. color. , enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de  
Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de  
Materiais, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Propriedades Físicas e Mecânicas dos Materiais.  
Orientação: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa.  
Coorientação: Profa. Dra. Morsyleide de Freitas Rosa.

1. Ciência dos materiais. 2. Biomateriais. 3. Síntese. I. Título.

---

CDD 620.11



Universidade Federal do Ceará  
Centro de Tecnologia  
Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais

PARECER DA COMISSÃO DE TESE DE DOUTORADO

EDEN BATISTA DUARTE

**Produção de nanocompósitos de celulose bacteriana e hidroxiapatita  
como rota para valorização de resíduos agroindustriais**

A Comissão de Tese composta pelos professores **Judith Pessoa de Andrade Feitosa**, Presidenta e Orientadora, da Universidade Federal do Ceará; **Ricardo Emílio Ferreira Quevedo Nogueira**, da Universidade Federal do Ceará; **Enio Pontes de Deus**, da Universidade Federal do Ceará; **Monica Yamauti**, da Universidade Federal de Minas Gerais e **Rossana Mara da Silva Moreira Thiré**, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, considera o candidato:

APROVADO

NÃO APROVADO

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais da Universidade Federal do Ceará, em 29 de agosto de 2014.

Prof. Judith Pessoa de Andrade Feitosa  
Presidenta e Orientadora

Prof. Ricardo Emílio Ferreira Quevedo Nogueira  
Membro

Prof. Enio Pontes de Deus  
Membro

Prof. Monica Yamauti  
Membro

Prof. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré  
Membro

A Deus, sem o qual jamais conseguiria realizar meus sonhos. Aos meus pais Miguel Batista Duarte (In Memoriam) e Maria Zeneida da Silva Duarte que sempre me apoiaram e incentivaram nas decisões da minha vida. Aos meus irmãos, Emily, Edmar, Edmilda e Edmilson.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e irmãos, pelo incentivo e apoio aos estudos em todos os momentos da minha vida.

Às minhas orientadoras, Judith Pessoa de Andrade Feitosa e Morsyleide de Freitas Rosa, pela amizade, respeito e pela orientação e sugestões transmitidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Ricardo Emílio Ferreira Quevedo Nogueira e Marcelo José do Carmo, pela amizade e admiração.

Aos pesquisadores Men de Sá Moreira de Souza Filho e Maria Fátima Borges, pelo apoio técnico na condução das pesquisas realizadas nos Laboratórios de Tecnologia da Biomassa e Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical.

A Lílian Chayn e Ana Cassales por todo o apoio, atenção e dedicação durante a realização das atividades no Laboratório de Tecnologia da Biomassa.

A todos os amigos e pesquisadores do Laboratório de Tecnologia da Biomassa pelas reflexões, críticas e sugestões. Em especial, Elígenes Sampaio do Nascimento, Helder Levi Silva Lima e Celso Pires de Araújo Júnior, pela grande ajuda e companheirismo.

Aos amigos do laboratório de microbiologia de alimentos cuja colaboração foi indispensável ao desenvolvimento deste trabalho. Em especial, Érika Patrícia Chagas Gomes, Antonia Régia Abreu Sobral, Bruna Santana das Chagas e Maria Karolina de Araújo Barroso.

Aos amigos dos laboratórios de desenvolvimento de materiais cerâmicos e de biomateriais (UFC). Em especial, Paulo Demétrios, Erisandra Alves e Fabiana Melo.

Ao amigo Sílvio Veras Albuquerque, sempre disposto a ajudar.

Aos professores, alunos e amigos da Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais.

Agradeço à Embrapa Agroindústria Tropical que, em parceria com o Departamento de Engenharia e Ciência de Materiais da Universidade Federal do Ceará, viabilizou a realização dos experimentos.

A Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa – Funcap – pela bolsa concedida.

“There’s no spoon.”

## RESUMO

Questões ambientais têm suscitado o interesse por fontes renováveis e os resíduos agroindustriais tornaram-se uma importante matéria prima para a produção de novos materiais, de produtos químicos e de energia. Esta tese propõe o uso de resíduos agroindustriais (suco de caju e líquido de sisal) na obtenção de celulose bacteriana (CB) para posterior preparo de nanocompósitos com hidroxiapatita (HA). A obtenção de CB se deu por cultivo de *Gluconacetobacter hansenii* em meio *Hestrin & Schramm* (contendo principalmente glicose como fonte de carbono), suco de caju e resíduo líquido de sisal, sob condições estáticas. Após o período de incubação, as membranas de CB foram purificadas e os nanocompósitos preparados por imersão sucessiva das membranas purificadas em soluções de Cloreto de Cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e Fosfato de Sódio ( $\text{NaHPO}_4$ ), seguida de secagem e posterior caracterização. As membranas de CB e os materiais nanocompósitos obtidos foram caracterizados por Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia de Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), Análise Termogravimétrica (ATG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e ensaios mecânicos. Adicionalmente, foram realizados testes *in vitro* para os nanocompósitos. Os resultados mostraram que houve produção de celulose a partir dos três substratos estudados, sem a necessidade de suplementação adicional ou alteração do pH. Por meio das caracterizações, foi possível verificar que as películas obtidas apresentaram estrutura e comportamento típicos de celulose bacteriana. A microscopia eletrônica de varredura permitiu investigar a morfologia das fibras de celulose e observar a deposição das partículas de hidroxiapatita. As propriedades mecânicas dos nanocompósitos, baseados em CB e HA, apresentaram diminuição do módulo elástico, comparativamente às películas puras, com aumento da elongação na ruptura. Os compósitos apresentaram bioatividade, estabilidade em solução e capacidade de adsorção de proteínas, aspectos que servem de indicativo para a biocompatibilidade desses materiais.

## ABSTRACT

Environmental issues have supported the interest in renewable sources and agroindustrial residues became a significative resource for the production of new materials, chemicals and energy. This thesis proposes the use of agroindustrial residues (cashew juice and sisal liquid waste) to obtain bacterial cellulose (BC) for further elaboration of nanocomposites with hydroxyapatite (HA). The production of BC membranes by *Gluconacetobacter hansenii* occurred in Hestrin & Schramm medium (containing mainly glucose as carbon sources), cashew juice and sisal liquid waste cultivated under static conditions. After the incubation period, the BC membranes were purified and nanocomposites prepared by successive immersion of the purified membranes in solutions of Calcium Chloride ( $\text{CaCl}_2$ ), and Sodium Phosphate ( $\text{NaHPO}_4$ ), followed by drying and subsequent characterization. The materials obtained were characterized by X-ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Spectroscopy (FTIR), Energy Dispersive Spectroscopy (EDS), Thermogravimetric Analysis (TGA), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Scanning Electron Microscopy (SEM) and mechanical tests. Additionally, *in vitro* tests were performed for nanocomposites. The results showed the production of cellulose from the three substrates studied, without the need for further supplementation or pH change. In all characterizations, structure and typical behavior of bacterial cellulose were found. Scanning electron microscopy allowed investigation of morphology of cellulose fibers and observation of deposition of hydroxyapatite particles. The mechanical properties of nanocomposites based on BC and HA showed decrease in elastic modulus compared to pure films with increase in elongation. The composites showed bioactivity, stability in solution and the adsorption capacity of proteins, which lead to potential biocompatibility of these materials.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação da molécula de celulose .....	5
Figura 2 - Número de documentos publicados no período 1973 - 2013 com o título " <i>bacterial cellulose</i> " segundo a base de dados Scopus.....	6
Figura 3 - Posicionamento das amostras no SBF .....	39
Figura 4 - Películas de celulose bacteriana obtidas após sete dias de cultivo em meio ALABAN .....	42
Figura 5 - Películas de celulose bacteriana obtidas após sete dias de cultivo em (a) suco de caju; (b) resíduo líquido de sisal.....	43
Figura 6 - Película de celulose bacteriana obtida em meio de cultivo ALABAN após etapa de purificação .....	44
Figura 7 - Película de celulose bacteriana obtida em resíduo líquido de sisal a) pré-purificação b) pós-purificação .....	45
Figura 8 - Película de celulose bacteriana obtida a partir do meio de composição definida (HS) .....	46
Figura 9 - Celulose bacteriana obtida a partir de: a) suco de caju, b) resíduo líquido de sisal.....	46
Figura 10 - Película de celulose bacteriana e compósito celulose bacteriana-hidroxiapatita .....	48
Figura 11 - EDS de celulose bacteriana obtida a partir de a) meio HS; b) suco de caju; c) resíduo líquido de sisal .....	49
Figura 12 - EDS dos compósitos CB-HA obtidos a partir de a) Meio HS; B) Suco de caju; c) Resíduo líquido de sisal.....	51
Figura 13 - Análise termogravimétrica da película de celulose bacteriana obtida em a) meio HS; b) suco de caju; c) resíduo líquido de sisal.....	53
Figura 14 - ATG do compósito CB-HA obtido a partir de a) meio HS; b) suco de caju; c) resíduo líquido de sisal .....	56
Figura 15 - Calorimetria exploratória diferencial da película de celulose bacteriana obtida em meio HS, suco de caju e resíduo líquido de sisal.....	59
Figura 16 - Calorimetria exploratória diferencial dos compósitos HS-HA, Caju-HA e Sisal-HA .....	60

Figura 17 - Difratograma da celulose bacteriana obtida a partir de meio HS, suco de caju e resíduo líquido de sisal.....	61
Figura 18 - Difratograma dos compósitos CB-HA .....	63
Figura 19 - Espectros de infravermelho das amostras celulose bacteriana de HS, suco de caju e resíduo líquido de sisal.....	64
Figura 20 - Espectros de infravermelho dos compósitos CB-HA.....	66
Figura 21 - Curvas de tensão - deformação para películas e compósitos.....	69
Figura 22 - Fotomicrografia da película seca de celulose bacteriana.....	70
Figura 23 - Fotomicrografias do compósito CB-HA (a) aumento de 1000x (b) aumento de 3000x.....	72
Figura 24 - Fotomicrografias do compósito Caju-HA (a) aumento de 1000x (b) aumento de 3000x.....	73
Figura 25 - Fotomicrografias do compósito Sisal-HA (a) aumento de 1000x (b) aumento de 3000x.....	74
Figura 26 - Imagens comparativas de filmes de CB e compósitos CB-HA após teste de bioatividade usando MEV .....	79
Figura 27 - Curva-padrão para proteína BSA em solução de PBS .....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidades de reagentes requeridas para o preparo das soluções A e B .....	39
Tabela 2 - Valores determinados de Brix, pH e acidez para os substratos estudados.....	41
Tabela 3 - Análise química por EDS da celulose bacteriana obtida a partir de meio HS, suco de caju e resíduo líquido de sisal .....	50
Tabela 4 - Análise química por EDS dos compósitos obtidos a partir de meio HS, suco de caju e resíduo líquido de sisal.....	52
Tabela 5 - Perda de massa percentual das amostras .....	56
Tabela 6 - Perda de massa percentual das amostras .....	58
Tabela 7 - Índices de cristalinidade (IC) para CB obtida em meio HS, suco de caju e resíduo líquido de sisal .....	62
Tabela 8 - Modos vibracionais na região do infravermelho para as películas de celulose puras .....	65
Tabela 9 - Dados de ensaio de tração para as películas de HS e sisal .....	67
Tabela 10 - Dados de ensaio de tração para os compósitos HS-HA e Sisal-HA .....	68
Tabela 11 - Análise de variância para o compósito HS-HA.....	76
Tabela 12 - Análise de variância para o compósito Caju-HA .....	77
Tabela 13 - Análise de variância para o compósito Sisal-HA.....	77
Tabela 14 - Massa percentual de hidroxiapatita depositada após teste de bioatividade .....	78
Tabela 15 - Quantidade de BSA adsorvida (mg de BSA/ g de compósito) .....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP - *Amorphous Calcium Phosphate*

ANOVA - *Analysis of Variance*

ASTM - *American Society for Testing and Materials*

ATCC - *American Type Culture Collection*

BSA - *Bovin Serum Albumin*

CB - Celulose Bacteriana

CCT - Coleção Culturas Tropical

cdHA - Hidroxiapatita Deficiente em Cálcio

CMC - Carboximetilcelulose

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

HA - Hidroxiapatita

JCPDS - *Joint Committee on Powder Diffraction Standards*

OCP - *Octacalcium Phosphate*

OLEDs - *Organic Light Emitting Diodes*

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

SBF - *Simulated Body Fluid*

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>4</b>
Geral .....	4
Específicos.....	4
<b>3. Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>5</b>
3.1. Celulose .....	5
3.2. Celulose Bacteriana .....	5
3.3. Obtenção de Celulose Bacteriana.....	7
3.3.1. <i>Uso de Meios Alternativos para Obtenção de Celulose Bacteriana.</i>	10
Suco de caju.....	12
Resíduo Líquido de Sisal.....	13
3.4. Aplicações da Celulose Bacteriana.....	14
3.5. Hidroxiapatita .....	16
3.5.1. <i>Obtenção de Hidroxiapatita .....</i>	18
3.6. Materiais Compósitos.....	20
3.6.1. <i>Compósito de Celulose Bacteriana e Hidroxiapatita (CB-HA) .....</i>	21
3.7. Estudo <i>in Vitro</i> .....	26
3.7.1. <i>Estudo de Degradação in Vitro dos Materiais Compósitos .....</i>	27
3.7.2. <i>Bioatividade .....</i>	27
3.7.3. <i>Adsorção de Proteína .....</i>	28
<b>4. Material e Métodos .....</b>	<b>30</b>
4.1. Material .....	30
4.1.1. <i>Micro-organismo .....</i>	30
4.1.2. <i>Meios de Cultura e Substratos Agroindustriais .....</i>	30
4.1.3. <i>Precursors da Hidroxiapatita.....</i>	31

---

## Sumário

4.2. Métodos .....	32
4.2.1. Caracterização dos Resíduos Agroindustriais .....	32
Acidez e pH .....	32
Refratometria na Escala Brix .....	32
4.2.2. Obtenção e Purificação da Película de Celulose Bacteriana .....	32
4.2.3. Obtenção dos Compósitos CB-HA.....	34
4.2.4. Caracterização dos Materiais Obtidos (CB e CB-HA).....	34
Análise Termogravimétrica (ATG).....	34
Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	35
Difração de Raios X (DRX).....	35
Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR).....	35
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	36
Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) .....	36
Determinação da Espessura .....	36
Ensaios Mecânicos.....	36
4.2.5. Estudo <i>in Vitro</i> .....	37
Estudo de Degradação <i>in Vitro</i> dos Materiais Compósitos.....	37
Bioatividade .....	38
Adsorção de Proteínas .....	40
<b>5. Resultados e Discussão.....</b>	<b>41</b>
5.1. Caracterização dos Resíduos Agroindustriais.....	41
5.2. Obtenção da Película de Celulose Bacteriana .....	42
5.3. Obtenção dos Compósitos CB-HA.....	47
5.4. Caracterização dos Materiais Obtidos (CB e CB-HA) .....	48
5.4.1. Determinação da Espessura.....	48
5.4.2. Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....	49
5.4.3. Análise Termogravimétrica (ATG).....	52

## Sumário

<i>5.4.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i> .....	58
<i>5.4.5. Difração de Raios X (DRX)</i> .....	60
<i>5.4.6. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)</i> ...	64
<i>5.4.7. Ensaios Mecânicos</i> .....	67
<i>5.4.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	70
5.5. Estudo <i>in Vitro</i> .....	75
<i>5.5.1. Estudo de Degradação in Vitro dos Materiais Compósitos</i> .....	75
<i>5.5.2. Bioatividade</i> .....	78
<i>5.5.3. Adsorção de Proteína</i> .....	80
6. Conclusões .....	83
Publicações Decorrentes deste Trabalho .....	84
Referências .....	86
Apêndice A - Dados de Monitoramento da Densidade Ótica e do pH dos Meios de Cultivo .....	104
<b>Anexo A - Caracterização Físico-Química do Resíduo Líquido de Sisal e do Suco de Caju Integral .....</b>	<b>105</b>

## 1. Introdução

O interesse crescente por materiais poliméricos que produzam melhor desempenho ambiental vem impulsionando estudos sobre novas fontes e aplicações inseridas no conceito de química verde. Entre os materiais de grande interesse está a celulose, o polímero natural mais abundante e um dos principais constituintes da parede celular de plantas, também sintetizado por alguns micro-organismos - conhecido como Celulose Bacteriana (CB).

Os estudos desenvolvidos com CB envolvem principalmente mecanismos de síntese deste biopolímero e aspectos relacionados à sua estrutura e propriedades, que são fatores determinantes para o tipo de aplicação (FU; ZHANG; YANG, 2013).

Tradicionalmente, celulose bacteriana é produzida a partir de meios de cultura sintéticos, contendo glicose como fonte de carbono e outras fontes de nutrientes, resultando em custo de produção muito elevado, o que limita o uso deste material para aplicações diversas (GOMES *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2014). O uso de fontes de carbono e nutrientes de baixo custo, como resíduos da agroindústria, é uma estratégia interessante para superar esta limitação e, portanto, aumentar a competitividade deste material singular (CAVKA *et al.*, 2013; ÇAKAR *et al.*, 2014). Nesse contexto, alguns resíduos industriais ou subprodutos, como cana de açúcar, sucos de frutas diversas e água de coco já foram utilizados com sucesso como fonte de carbono para a produção de CB (CARREIRA *et al.*, 2011). Todavia, há ainda inúmeros outros produtos ou resíduos da agroindústria com potencial aplicação nesta área de estudo. No processo de beneficiamento da fibra de sisal, por exemplo, gera-se um líquido que responde por mais de 90% do peso da planta, conhecido como suco de sisal. Esse resíduo líquido é totalmente descartado no campo. Até 2009, por exemplo, a quantidade estimada de desperdício já alcançava a marca de dois bilhões de litros anuais, segundo dados da FAPESP.

Problemas associados às perdas no campo também envolvem o pedúnculo do caju. Estima-se que 80% do pedúnculo são desperdiçados, valores que chegam a quase 1,5 milhões de toneladas anuais (PINHEIRO,

2011). Essa quantidade do pedúnculo, hoje perdida, representa uma fonte de açúcar e nutrientes, com potencial para ser utilizada como meio de cultura para o desenvolvimento de celulose bacteriana.

A CB possui uma estrutura reticulada ultrafina naturalmente nanométrica e quimicamente pura, o que a distingue da celulose obtida a partir de fontes vegetais, usualmente associada à lignina e hemicelulose (SHI *et al.*, 2014). É biocompatível, não tóxica e não alergênica, apresenta alta porosidade, baixa densidade e alta capacidade de absorção e retenção de água (RECOUVREUX, 2008). Além disso, sua estrutura altamente cristalina favorece a produção de materiais com propriedades mecânicas superiores, o que permite seu emprego na obtenção de nanocompósitos com materiais variados, como, por exemplo, hidroxiapatita (GRANDE *et al.*, 2009).

As propriedades biológicas da hidroxiapatita sintética são bem documentadas na literatura. Ela tem sido estudada por tratar-se de uma substância bioativa e não tóxica que provoca pouca reação tecidual. Seu emprego tem sido muito diversificado, sendo utilizada para a reconstrução e preenchimento de falhas ou defeitos ósseos e revestimento de componentes metálicos para fixação óssea (DONINI *et al.*, 2010).

Em geral, compósitos obtidos a partir de celulose bacteriana e hidroxiapatita (CB-HA) apresentam potencial para aplicação em engenharia de tecido ósseo (GRANDE *et al.*, 2009) em razão de características como elevadas propriedades mecânicas, maior controle do tamanho de poro, moldabilidade, estrutura de rede tridimensional, alta capacidade de retenção de água, excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade ajustável, dentre outras (GRANDE *et al.*, 2009; SHI *et al.*, 2009; TAZI *et al.*, 2012; ZIMMERMANN *et al.*, 2011).

A presente proposta visou ampliar as possibilidades de uso da CB, avaliando fontes alternativas de substrato, oriundas de resíduos agroindustriais, e abrir espaço para novas aplicações deste biopolímero com ênfase em materiais nanoestruturados, especificamente nanocompósitos elaborados a partir de celulose bacteriana e hidroxiapatita. Técnicas tradicionais de caracterização de materiais foram utilizadas, a exemplo de difração de Raios X, espectroscopia de transformada de Fourier, microscopia eletrônica e análise termogravimétrica. Adicionalmente, foram conduzidos testes *in vitro* a fim de se

averiguar propriedades importantes requeridas para os compósitos como bioatividade e biocompatibilidade.

## 2. Objetivos

### Geral

Este trabalho tem como objetivo principal a obtenção de nanocompósitos de celulose bacteriana e hidroxiapatita como forma de aproveitamento de resíduos agroindustriais.

### Específicos

No escopo do objetivo geral, foram definidas as seguintes etapas:

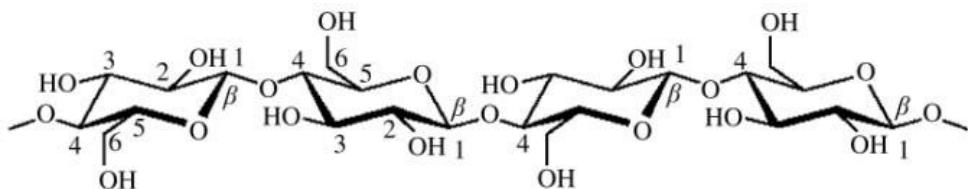
1. Obtenção de celulose bacteriana mediante inoculação da bactéria *Gluconacetobacter hansenii* em um meio sintético de composição definida e, posteriormente, nos diferentes substratos, suco de caju e resíduo líquido de sisal.
2. Preparo de nanocompósitos de celulose bacteriana e hidroxiapatita.
3. Realização de ensaios visando a caracterizações microestrutural e mecânica dos biopolímeros de celulose bacteriana e seus nanocompósitos.
4. Realização de ensaios para estudo *in vitro* dos nanocompósitos.

### 3. Revisão Bibliográfica

#### 3.1. Celulose

Originalmente isolada e caracterizada pelo químico francês Anselme Payen (1838), a celulose ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> é um polímero de cadeia longa composto de um só monômero (glicose), classificado como homopolissacarídeo. Apresenta uma estrutura fibrosa, na qual se estabelecem múltiplas ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila das distintas cadeias justapostas de glicose, originando fibras compactas que constituem a parede celular dos vegetais. A estrutura da celulose (FIGURA 1) se forma pela união de moléculas de  $\beta$ -glicose (uma hexosana) através de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas (KLEMM *et al.*, 2001; SHI *et al.*, 2014).

Figura 1 - Representação da molécula de celulose



Fonte: Klemm (2001)

A celulose é o polímero natural mais abundante da terra, podendo ser encontrada como um dos principais constituintes das paredes celulares das plantas (celulose vegetal) ou sintetizada por alguns micro-organismos, tais como bactérias (celulose bacteriana).

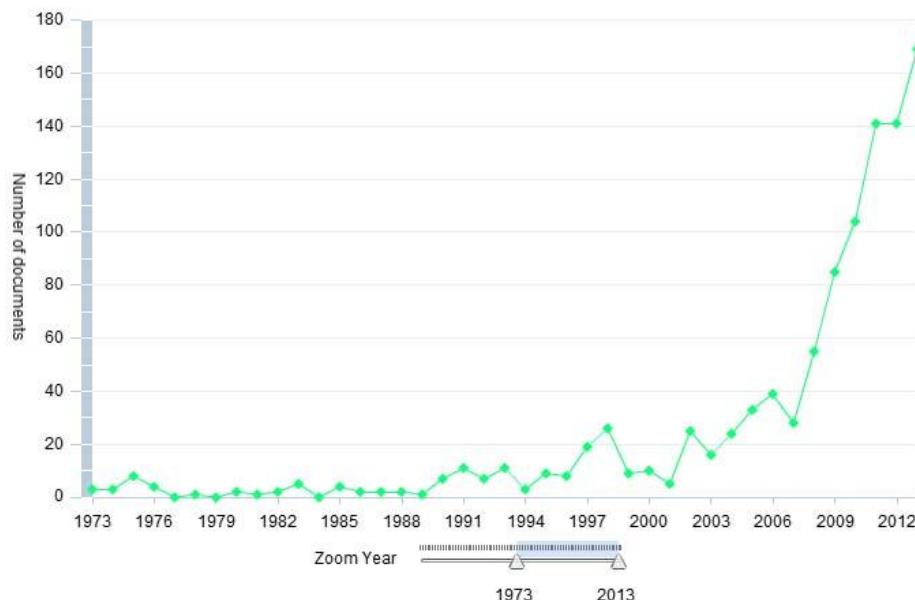
#### 3.2. Celulose Bacteriana

Os polissacarídeos de origem microbiana têm sido bastante estudados devido a algumas vantagens de sua obtenção, tais como: produção independente de condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias-

primas regionais, maior rapidez na obtenção do produto acabado e necessidade de espaço relativamente pequeno (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004). Além disso, esses polímeros apresentam maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas devido à especificidade do micro-organismo utilizado e à possibilidade de um rígido controle dos parâmetros de fermentação, o que garante uma alta regularidade estrutural (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

Dentre os biopolímeros atualmente estudados, a celulose bacteriana vem apresentando interesse crescente (FIGURA 2) por apresentar propriedades peculiares que a diferem consideravelmente da celulose vegetal. Além de ser obtida quimicamente pura, ou seja, livre de lignina e hemicelulose, é extremamente hidrofílica e possui cristalinidade superior à apresentada pela celulose vegetal (RECOUVREUX, 2008).

Figura 2 - Número de documentos publicados no período 1973 - 2013 com o título "*bacterial cellulose*" segundo a base de dados Scopus



Fonte: Base de dados Scopus<sup>1</sup>

As membranas de CB apresentam ainda características importantes, tais como: biocompatibilidade, biodegradabilidade e permeabilidade seletiva (NUNES, 2012). Além disso, também desempenham o papel de barreira contra micro-organismos em feridas e queimaduras, acelerando o processo de

<sup>1</sup> <http://www.scopus.com/home.url>

cicatrização, proporcionando alívio da dor e redução da formação de cicatriz (SASKA *et al.*, 2011). Essas propriedades aliadas a sua estrutura tridimensional nanométrica conferem um amplo leque de aplicações que se estende desde a indústria de papel e têxtil até a indústria alimentícia (BIELECKI *et al.*, 2005).

Na área médica, destaca-se a aplicação de CB como substituto temporário da pele no tratamento de queimados e feridas de difícil cicatrização (BIELECKI *et al.*, 2005; KLEMM *et al.*, 2001; SASKA *et al.*, 2011; SHELKE *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2014). Membranas de CB têm sido usadas para regeneração óssea guiada, em lesões periodontais e como uma membrana de barreira reabsorvível. Em paralelo, a estrutura da celulose também tem encontrado uso como "*template*" para a preparação de metais com dimensões nanométricas (BARUD *et al.*, 2008). A incorporação de metais na membrana de celulose é bastante interessante devido às propriedades de coordenação e porosidade da matriz (BARUD *et al.*, 2008). A sua incorporação em tecidos e membranas para curativos já pode ser encontrada em produtos comerciais (ABEER *et al.*, 2014; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012; PERTILE, 2007; SASKA *et al.*, 2011).

### **3.3. Obtenção de Celulose Bacteriana**

O primeiro estudo documentado relacionado à produção de celulose por bactérias foi relatado em 1886 por Adrian Brown. Ele observou um material gelatinoso que se formava na superfície do caldo de fermentação do vinagre (DONINI *et al.*, 2010;). A análise desse material revelou que se tratava de celulose e a bactéria produtora foi identificada como *Acetobacter xylinum* (BROWN, 1886). Entre os anos de 1940 a 1960, pesquisadores da Hebrew University em Jerusalém investigaram intensamente a bioquímica da produção de celulose por *A. xylinus*. Eles publicaram quatro artigos detalhando métodos simplificados para a produção e quantificação da celulose produzida por esse micro-organismo (HESTRIN; SCHRAMM, 1954b; SCHRAMM; HESTRIN, 1954; GROMET; SCHRAMM; HESTRIN, 1957; SCHRAMM; GROMET; HESTRIN,

1957). Tais métodos são amplamente utilizados nos dias atuais (RECOUVREUX, 2008).

Estudo filogenético desenvolvido por Yamada, Hoshino e Ishikawa (1997) reclassificou a bactéria *A. xylinum* (= *A. aceti* ssp. *xylinum*, *A. xylinus*) incluindo-a no novo gênero *Gluconacetobacter*. A bactéria *A. xylinum* ATCC 23769, utilizada neste estudo, foi reclassificada como *Gluconacetobacter hansenii* (YAMADA; HOSHINO; ISHIKAWA, 1997). *G. hansenii* é uma bactéria conhecida por produzir celulose na forma de uma película na interface líquido-ar do meio de cultivo, em cultura estática (RECOUVREUX, 2008). Bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, são bacilos retos ou ligeiramente curvos, móveis ou não. Produzem ácido acético na presença de oxigênio, apresentam tolerância a condições ácidas, sendo capazes de crescer em valores de pH inferiores a 5,0, e a faixa ótima de temperatura de crescimento está entre 15 e 34°C. Além disso, *G. hansenii* é estritamente aeróbica, Gram negativa, catalase positiva, incapaz de liquefazer gelatina e não reduz nitrato e nitrito. Sua temperatura de destruição térmica é de 65 a 70°C (MADALOZZO, 2008).

Embora seja comum o emprego de *G. hansenii*, existem muitos outros organismos que também produzem celulose, incluindo plantas, bactérias eucarióticas, organismos procarióticos e fungos (LUCIA; ROJAS, 2009). Entretanto, *G. hansenii* tem sido aplicada como micro-organismo modelo para estudos básicos e aplicados sobre a celulose devido à sua capacidade de produzir níveis relativamente altos do biopolímero a partir de uma ampla gama de fontes de carbono e nitrogênio.

Em geral, os meios para produção de polissacarídeos apresentam uma fonte de fósforo (fosfato de potássio) e nitrogênio (sulfato de amônio) em concentrações adequadas para o crescimento do microrganismo; uma fonte de carbono (glicose, sacarose, manose, frutose e outras) como reserva energética e ainda oligoelementos como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e outros, os quais têm um papel importante como cofatores enzimáticos nas vias de produção do polissacarídeo. Um meio bastante utilizado tem sido o ALABAN (ALABAN, 1962). Madalozzo (2008) constatou que a produção da celulose na superfície do meio de cultura ALABAN (caldo) é característica da *G. hansenii*, por ser uma forma de assegurar sua permanência na interface líquido-ar, onde o oxigênio está mais concentrado. Acredita-se que a celulose sirva para manter a

bactéria em ambiente aeróbico na superfície do meio onde se encontra. A celulose produzida pode atuar como uma matriz extracelular para acentuar a colonização no meio e prevenir a potencial presença de competidores pelo substrato. A película de celulose também pode auxiliar na retenção da umidade impedindo o ressecamento dos substratos naturais durante o crescimento da bactéria.

A celulose produzida por bactérias é também conhecida como celulose nativa. A celulose nativa é encontrada em duas formas cristalinas, celulose I e celulose II, sendo mais comumente encontrada como celulose I. As cadeias glucanas são orientadas paralelamente na celulose I e por cadeias antiparalelas na celulose II, termodinamicamente mais estável, pois possui uma ligação de hidrogênio adicional por cadeia de glicose (CHAWLA *et al.*, 2009). A estrutura em forma de microfibras da celulose bacteriana é responsável por boa parte de suas propriedades, a saber: alta resistência à tração, elevado grau de polimerização e cristalinidade (HU *et al.*, 2014).

Existem duas formas de se produzir celulose bacteriana: cultivo estático, que resulta na formação de uma membrana gelatinosa de celulose na superfície do meio, e cultivo agitado, através do qual a celulose é sintetizada na forma de *pellets*. Alguns pesquisadores têm sugerido que a cultura agitada pode ser a técnica mais adequada para produção em escala econômica (CZAJA; ROMANOVICZ; BROWN, 2004; DONINI *et al.*, 2010; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; YOSHINAGA; TONOUCHI; WATANABE, 1997). Contudo, a maior parte das cepas de *G. hansenii* usadas em pesquisa produz celulose em condições puramente estáticas. Quando o cultivo é feito em condições agitadas os resultados muitas vezes apresentam um baixo rendimento. Almeida *et al.* (2008) realizaram estudo a fim de verificar o crescimento da biomassa de *G. hansenii* com a produção da celulose bacteriana. O cultivo ocorreu em água de coco maduro na forma estática e em agitação e com adição de diferentes soluções salinas. Após 16 dias, não foi observado nenhum aumento significativo na síntese de celulose em cultura agitada, enquanto que a película cultivada em cultura estacionária atingiu um valor de massa seca de 10 g/L. Através da análise dos *pellets*, os autores observaram que a maior parte das células ficava concentrada na sua superfície, ao passo que apenas uma pequena quantidade podia ser encontrada no seu interior. Outro aspecto

interessante diz respeito à comparação microscópica entre as fibras de celulose sintetizadas nos dois diferentes casos. Enquanto fibras obtidas via cultivo estático apresentaram uma orientação preferencial na direção axial, aquelas geradas por cultivo agitado se mostraram mais desordenadas e sobrepostas. Tal desordem para a microestrutura pode ser atribuída à movimentação constante durante a agitação.

Madalozzo *et al.* (2008) conseguiram, através de folhas de capim-limão *in natura*, isolar *G. hansenii*, capaz de produzir uma película na superfície do meio de cultura ALABAN, embora em pequena quantidade. O isolamento dessa bactéria em folhas de capim-limão foi atribuído ao fato de que esse micro-organismo é comumente encontrado na natureza, principalmente em superfície de plantas, frutas e flores, quando há início de decomposição envolvendo a acidificação do meio.

Um aspecto importante na obtenção de celulose bacteriana diz respeito à sua remoção do meio e purificação. Saharman Gea e colaboradores (2011) desenvolveram um processo de purificação que melhora significativamente o comportamento estrutural, mecânico, térmico e morfológico de CB produzida em cultura estática. Nessa pesquisa, ressalta-se a importância dos tratamentos de purificação, os quais visam, sobretudo, à remoção dos compostos orgânicos (como ácidos nucleicos e proteínas remanescentes a partir do meio de cultura) ou alguma impureza. Ao mesmo tempo, impedem a transformação polimórfica de celulose tipo I para celulose tipo II. A purificação também melhorou a estabilidade térmica e morfológica das películas. Após a etapa de purificação, a CB pode ser prontamente utilizada.

### **3.3.1. Uso de Meios Alternativos para Obtenção de Celulose Bacteriana**

Resíduos agroindustriais (bagaços, tortas, restos de frutas e hortaliças, etc.) são provenientes de usinas sucroalcooleiras, matadouros, indústrias do processamento de carnes (vísceras e carcaça de animais), frutas e hortaliças (bagaço, tortas, refugo e restos), indústria da celulose e papel (resíduos da madeira, lodo do processo de produção e do tratamento de águas

residuárias), curtumes (aparas de couro e lodo do processo e tratamento de águas residuárias) e outros (DANTAS; AQUINO, 2010).

O descarte de resíduos representa um crescente problema devido ao aumento da produção. Os maiores impactos ambientais provocados por resíduos orgânicos são decorrentes da fermentação do material, podendo ocasionar a formação de ácidos orgânicos (“chorume” – líquido de elevada demanda bioquímica de oxigênio formado com a degradação do material orgânico e a lixiviação de substâncias tóxicas) com geração de maus odores e diminuição do oxigênio dissolvido em águas superficiais (GRAMINHA *et al.*, 2008).

Devido à quantidade de nutrientes disponíveis nos resíduos agroindustriais, esses podem ser convertidos em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários. Neste contexto, a fermentação desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos visando à síntese de diversos compostos de alto valor agregado e de grande interesse industrial (DANTAS; AQUINO, 2010). A produção de biopolímeros a partir de resíduos, por exemplo, se mostra interessante por duas razões: utilização de matéria prima de baixo custo e redução de poluentes ambientais (MATIAS, 2009).

Vários resíduos da agroindústria foram avaliados como fonte econômica de carbono e demais nutrientes para a produção de celulose bacteriana, os quais, acredita-se, apresentam cargas orgânicas e nutrientes adequados para o crescimento microbiano (CARREIRA *et al.*, 2011). Segundo os autores, a exploração maciça dos recursos fósseis durante o século passado, associada a problemas de poluição levantou uma série de questionamentos dos pontos de vista ambiental e econômico. Além disso, a escassez de recursos fósseis num futuro próximo tem contribuído progressivamente para uma economia baseada em matérias-primas renováveis (biomassa) visando à produção de produtos químicos, materiais variados, combustíveis e energia dentro da nascente bioeconomia. Sob este ponto de vista, polímeros obtidos a partir de recursos renováveis, como polissacarídeos, entre outros, estão ganhando considerável atenção.

O Brasil produz uma grande quantidade de substratos, mas que na realidade ainda são resíduos descartados pelas agroindústrias, tornando-se

agentes poluidores do meio ambiente ou utilizados em pequena escala para a alimentação de animais (DRUZIAN; PAGLIARINI, 2007).

Danesi e Wosiacki (1998) relatam que resíduos agroindustriais, como soro de leite ou mesmo suco de frutas, podem ser utilizados como meio de cultivo para a *G. hansenii*. Gomes *et al.* (2013), por sua vez, enumeraram alguns resíduos industriais já empregados com sucesso para a produção de CB, como, por exemplo, pós de konjac, melaço de beterraba, melaço de cana de açúcar, água de maceração do milho e vários sucos de frutas, incluindo laranja, abacaxi, maçã, pera japonesa e uva, bem como água de coco.

O suco de caju e o resíduo líquido de sisal pertencem a duas importantes cadeias agroindustriais e representam fontes potenciais de carbono e nutrientes, que podem ser estudados como meio alternativo para a obtenção de CB.

### Suco de caju

O cultivo do cajueiro tem grande importância para a agroindústria dos Estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, onde são colhidos 95% da produção brasileira e onde é feito todo o processamento da castanha. O agronegócio do caju movimenta cerca de 157 milhões de dólares somente em exportações de amêndoas (LAMAS, 2010). Apesar da importância sócio-econômica da cajucultura, esta exploração ainda não é intensa em tecnologia. O uso de técnicas modernas pode ser decisivo para a mudança do atual perfil deste importante agronegócio pela possibilidade de aumento da produtividade e qualidade dos seus produtos (LAMAS, 2010).

O cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) pertence à família anacardiaceae, nativo da América do Sul e cresce também nos trópicos das Américas, África e Ásia. Em função do porte da planta, ele é dividido em dois grupos: o comum e o anão. O comum é o que apresenta maior porte, conhecido também como cajueiro gigante. É o mais difundido, de altura entre 8 e 15 m e envergadura que pode atingir até 20 m. O cajueiro anão é de porte baixo, altura inferior a 4 m, diâmetro do caule e envergadura inferiores ao do tipo comum e inicia o florescimento entre 6 e 18 meses, enquanto que o comum tem sua primeira floração entre o terceiro e quinto ano (PINHO, 2009).

Apesar do aumento do consumo *in natura* e do caju ser uma importante fonte de nutrientes do Nordeste do Brasil, o mesmo representa grande quantidade de matéria-prima perdida anualmente. Estima-se que 80% do pedúnculo seja desperdiçado, correspondendo a valores que chegam a quase 1,5 milhões de toneladas (PINHEIRO, 2011). Dentre os fatores que influenciam o elevado desperdício estão o curto período de pós-colheita associado à pequena capacidade de aproveitamento pela indústria, o curto período de safra e a inexistência de métodos econômicos de preservação da matéria-prima. Há diversas possibilidades de aproveitamento industrial do pedúnculo, tais como: produção de sucos, doces, cajuína, bebidas alcoólicas, sorvetes e outros produtos alimentícios, além de usos medicinais (PINHO, 2009).

O pedúnculo, apesar de ser utilizado na obtenção de sucos e doces, ainda é bastante desperdiçado nas agroindústrias de fabricação de bebidas, pois o bagaço geralmente é transformado em adubo ou em ração para animais, e poderia ser mais bem aproveitado em outras aplicações como a produção de celulose bacteriana. O aproveitamento de resíduos pode representar um segmento importante para as indústrias. Esses resíduos são constituídos basicamente de matéria orgânica, bastante rica em açúcares e fibra, com alto valor nutritivo, abundantes e de baixo custo econômico (SANTANA; SILVA, 2008).

### Resíduo Líquido de Sisal

O sisal (*Agave sisalana*) é uma planta pertencente à classe das monocotiledôneas, com elevada complexidade morfológica, cujo produto principal é a fibra tipo dura, com altos teores de celulose e lignina (NOGUEIRA; PIRAS, 2011). Em 2008, a produção de sisal foi de cerca de 250 milhares de toneladas, com Brasil, Tanzânia e Quênia se destacando como os maiores produtores mundiais (ANDRADE *et al.*, 2012). Segundo dados da Embrapa Algodão (Campina Grande – PB), o Brasil é o maior produtor mundial da fibra de sisal, uma das fibras naturais mais amplamente utilizadas em todo o mundo, com uma produção anual de cerca de 140.000 ton. A grande utilização das fibras de sisal se deve a características como seu baixo custo e densidade,

boas propriedades mecânicas e não toxicidade (ANDRADE *et al.*, 2012). Há ainda um interesse crescente na exploração de novas aplicações para o sisal, como, por exemplo, reforço de polímeros, borracha, gesso e matrizes de cimento, criando uma vasta gama de aplicações tecnológicas. No entanto, a sua utilização principal é, ainda hoje em dia, como matéria-prima para a indústria de corda. Os principais produtos são os fios biodegradáveis utilizados em artesanato; no enfardamento de forragens; cordas de várias utilidades, inclusive navais; torcidos, terminais e cordéis.

O beneficiamento do sisal para a produção da fibra produz resíduos, como pedaços de folhas e fibras de diferentes tamanhos. Além disso, no processo de beneficiamento da fibra, gera-se um líquido que responde por mais de 90% da planta, usualmente conhecido como suco de sisal. Esse resíduo líquido, resultante da extração da fibra do sisal, é totalmente descartado no campo. Segundo Nogueira e Piras (2011), a presença de alto teor de carboidratos no resíduo torna viável seu emprego em processos que envolvem modificações fermentativas, indicando seu potencial para ser transformado em produtos de valor agregado.

Vale ainda frisar, como motivação para a utilização de líquido de sisal, a crescente preocupação em todo mundo no que diz respeito à poluição ambiental, o que tem encorajado o desenvolvimento de estratégias diversas como alternativas para a simples eliminação de resíduos.

### **3.4. Aplicações da Celulose Bacteriana**

A celulose, em especial a produzida pela bactéria *G. hansenii*, destaca-se como biomaterial para cicatrização de feridas e produção de scaffolds (arcabouços) na engenharia de tecidos (FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012). Sua estrutura tridimensional é uma característica essencial para o uso como suporte, pois facilita a fixação e a proliferação de células que formam o tecido novo (SILVA, 2012).

Em 1980, a Johnson & Johnson iniciou a produção em larga escala da membrana de CB e, posteriormente, a empresa Xylos iniciou a manufatura da XCell® para o tratamento de feridas. No Brasil, a principal produtora de

membranas de celulose para diversos usos no tratamento de feridas da pele e queimaduras é a empresa Bionext Produtos Biotecnológicos Ltda., antiga e pioneira BioFill (DONINI *et al.*, 2010). Além do Brasil, no Canadá, nos Estados Unidos e no Japão, há empresas que atuam comercializando a membrana de celulose bacteriana (HOENICH, 2006). No entanto, ainda existem poucas aplicações em nível comercial. Outra aplicação comercial de celulose bacteriana é em transdutores acústicos, tendo em conta a grande resistência mecânica que adquire depois de ter sido submetida a um tratamento químico (PINEDA; MESA; RIASCOS, 2012).

Nas Filipinas é consumido como alimento conhecido como nata de coco (DANESI; WOSIACKI, 1998; SHI *et al.*, 2014).

No campo da eletrônica foram desenvolvidas membranas com alta condutividade elétrica e dispositivos emissores de luz através da incorporação de metais na estrutura da celulose. Além disso, algumas das membranas foram modificadas com paládio e platina para serem utilizadas em células de combustível e de reatores catalíticos, mostrando boa adesão das substâncias introduzidas na estrutura de celulose (PINEDA; MESA; RIASCOS, 2012).

Outros estudos demonstraram o uso de membranas de celulose bacteriana em processos de separação, como o realizado por Wanichapichart *et al.* (2002), em que membranas de celulose foram avaliadas para permeação de soluções de soro bovino. As membranas foram também utilizadas para a separação de polióis, clarificação de suco de frutas, pervaporação de misturas etanol-água, pervaporação de componentes aromáticos de frutas, diálise e permeação de gases (PINEDA; MESA; RIASCOS, 2012).

Donini *et al.* (2010) enumeraram diversas aplicações tecnológicas da membrana de CB como no diafragma para fones de ouvido da multinacional japonesa Sony, na utilização como substrato para OLEDs e como base para compósitos pela inserção de: prata, fosfato, pectina, amido, termoplásticos, ouro, sílica etc. A elaboração de compósitos pode ocorrer durante a fermentação (*“in situ”*) ou ao final, após a formação da película. Esta possibilidade de inserção de materiais nas fibras de CB, não só através do cultivo, mas também com a membrana *in natura*, levou a um crescente interesse em pesquisas com a CB na elaboração de nanocompósitos (BARUD,

2006; BARUD, 2010; DONINI *et al.*, 2010; RECOUVREUX *et al.*, 2008; SOMSUB; AHT-ONG, 2012; WAN *et al.*, 2006).

A inserção “*in situ*”, permite que materiais sejam incorporados na rede de fibras através da difusão dos mesmos no meio de cultura, o que leva à formação de estruturas com qualidades adicionais. As adições “*in situ*” vêm sendo bastante abordadas na literatura, a exemplo da hidroxiapatita (WAN *et al.*, 2007) e colágeno (LUO *et al.*, 2008) em regeneração óssea guiada e nanotubos de carbono (JUNG *et al.*, 2008; YAN *et al.*, 2008) que possuem diversas aplicações tecnológicas.

No caso da incorporação de materiais sobre a superfície da película já formada, Hutchens e colaboradores (2006) publicaram uma patente envolvendo compósito de celulose bacteriana para aplicação como biomaterial. Para tal, película de CB foi imersa em soluções de hidrogênio fosfato de sódio e cloreto de cálcio, alternadamente. Através da difração de Raios X comprovaram a incorporação de cálcio e fosfato no biopolímero (YAN *et al.*, 2008).

### **3.5. Hidroxiapatita**

A hidroxiapatita (HA) é um fosfato de cálcio hidratado de composição  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , componente majoritário da fase mineral dos ossos e dentes humanos (95%). Compõe o esqueleto dos vertebrados, atuando como reserva de cálcio e fósforo, e pode ser produzida em laboratório. Em função de sua semelhança química com a fase mineral dos tecidos ósseos se torna um dos materiais mais biocompatíveis conhecidos, sendo capaz de favorecer o crescimento de osso nos locais em que ela se encontra (osteocondutora), de estabelecer ligações de natureza química entre ela e o tecido ósseo (bioativa) e de permitir a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, as quais não a distinguem da superfície óssea, dada sua grande similaridade química superficial (CUNHA, 2010; RIBEIRO, 2009; SANTOS, 2002). A superfície da hidroxiapatita permite a interação de ligações do tipo dipolo, fazendo que moléculas de água e, também, de proteínas e colágeno sejam

adsorvidas na superfície induzindo, assim, a regeneração tecidual (LICKORISH *et al.*, 2004; SANTOS, 2002).

Produzida sinteticamente desde o início dos anos 70, a hidroxiapatita tem sido usada clinicamente desde o início dos anos 80 (SCHMITZ; HOLLINGER; MILAM, 1999). No tratamento de tumores, esse biomaterial vem sendo usado como suporte de ação prolongada. A introdução de fármacos anticancerígenos em blocos de hidroxiapatita porosa permite que o tratamento da doença seja realizado com a liberação gradual da droga no organismo. Sob este aspecto, essa técnica é atrativa, pois combina o tratamento do tumor com a neoformação do osso reabsorvido. Na área odontológica, a hidroxiapatita é utilizada para evitar perda óssea após extração de um ou vários elementos dentários, como também, recuperação de áreas com reabsorção ósseas. Pinos de titânio revestidos com hidroxiapatita são usados no implante para a substituição da raiz (COSTA *et al.*, 2009).

A estrutura favorável à invasão vascular e as características químicas da hidroxiapatita possibilitam seu uso na área médica e odontológica, como material biocompatível em implantes e próteses, principalmente, na forma particulada. Porém, um dos maiores problemas de sua utilização nessa forma é sua dispersão para zona de tecidos moles, causando problemas como a perda de partículas (COSTA *et al.*, 2009; RIGO; GEHRKE; CARBONARI, 2007). Esta dificuldade em manter os grânulos no local do defeito ósseo, bem como a lentidão de reabsorção e integração, levaram à necessidade de criar compósitos e pastas com características de biofuncionalidade superiores às dos seus constituintes individuais (RIBEIRO, 2009). Nesse contexto, a literatura propõe sua utilização na forma particulada e combinada com materiais diversos, tais como: elastina, quitosana e colágeno, a fim de facilitar o manuseio e a adaptação adequada do material e minimizar o desalojamento das partículas (ANGELE *et al.*, 2004; SOSNIK; SEFTON, 2005). Vários autores sugerem o colágeno para este fim, pois este material constitui-se em um grande agente de união, biocompatível e reabsorvível, responsável pela preservação da migração das partículas cerâmicas, até a incorporação pelo tecido do paciente (COSTA *et al.*, 2009).

As aplicações da hidroxiapatita sintética não se restringem à área biomédica. Devido à sua grande afinidade por proteínas, ela tem sido aplicada

como adsorvente em cromatografia líquida. Na linha de controle ambiental, a hidroxiapatita vem sendo estudada como catalisador na decomposição de compostos orgânicos clorados poluentes provenientes da indústria metalúrgica e da incineração do lixo industrial (COSTA et al., 2009). É um catalisador efetivo para desidratação e desidrogenação de álcoois primários para aldeídos e cetonas, a altas temperaturas. Ainda na área ambiental, a HA apresenta uma alta capacidade em remover metais pesados, não só de águas e solos contaminados, como também de dejetos industriais (COSTA et al., 2009). Essa aplicação tem sido objeto de grandes investigações devido ao alto grau de toxidez proveniente desses metais, em especial o chumbo por ser mais difundido no meio ambiente, aliado ao fato da hidroxiapatita representar um material de baixo custo que poderia ser usado no controle da poluição ambiental (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

Santos (2002) e Ribeiro (2009) enumeram ainda como principais aplicações da hidroxiapatita: reparo de defeitos ósseos em aplicações ortopédicas, aumento de rebordo alveolar, regeneração guiada de tecidos ósseos, reconstrução bucomaxilofacial, equipamentos percutâneos, reparo e substituição de paredes orbitais, substituição do globo ocular e recobrimento de implantes metálicos.

### **3.5.1. Obtenção de Hidroxiapatita**

A hidroxiapatita pode ser obtida por desproteinização de tecido ósseo, por tratamento hidrotérmico de corais e também por processos sintéticos, tais como: precipitação de soluções aquosas e reações no estado sólido (COSTA et al., 2009). Um dos métodos mais utilizados para síntese de pós de hidroxiapatita é a técnica de precipitação, que envolve reações por via úmida entre precursores de cálcio e fósforo com controle de temperatura e pH da solução. O pó precipitado é calcinado a 400-600°C ou até mesmo a temperaturas mais elevadas, a fim de obter uma estrutura de apatita estequiométrica. Outro método químico via úmida, mas que dispensa a utilização de temperaturas elevadas é o processo sol-gel. Devido à possibilidade de um controle cuidadoso dos parâmetros do processo, é

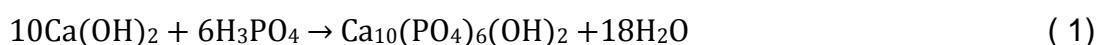
possível preparar um pó altamente puro e com boa homogeneidade química e física (COSTA *et al.*, 2009).

O método de síntese adotado para a obtenção de hidroxiapatita ou o seu tratamento posterior pode levar ao aparecimento de outras fases de compostos de fosfato de cálcio. Estando presentes, podem ser detectadas através de difratometria de Raios X. Normalmente, estas fases apresentam-se em quantidades pequenas (ao redor de 5%) em compostos comerciais. Entretanto, cuidados devem ser tomados para controlar a quantidade destes compostos, por possuírem propriedades extremamente diferentes da hidroxiapatita que podem comprometer a osteocondução, a integridade e a eficiência mecânica do material (SALEH *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2009).

A hidroxiapatita na forma de pó pode ser obtida por:

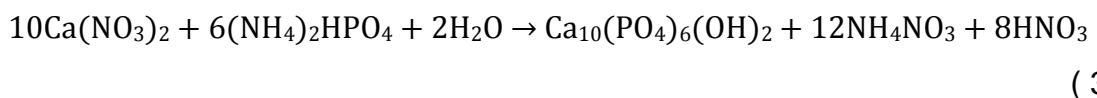
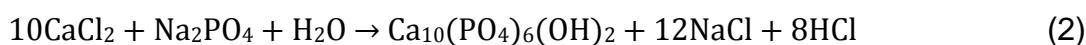
#### Métodos Via Úmida

##### a) Reação ácido-base



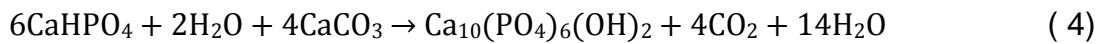
##### b) Reação entre sais de fosfato

O produto é um pó de partículas pequenas (<10 µm) e cristalinidade similar aos tecidos naturais, porém, apresenta baixa cristalinidade:



#### Método Via Seca

O produto é um pó de alta cristalinidade, obtido por volta de 900°C:



#### Método Hidrotermal

Método idêntico à via úmida sob alta pressão e temperatura. O produto é um pó nanométrico ou milimétrico, sendo possível a obtenção de materiais com porosidade similar à hidroxiapatita obtida de corais. A partir dos diferentes pós, podem-se obter diferentes morfologias e formatos de materiais,

sejam densos ou extremamente porosos, os quais incluem técnicas de processamentos cerâmicos tradicionais e avançadas como: prensagem, *gel casting*, injeção, sol-gel etc. (COSTA *et al.*, 2009).

### **3.6. Materiais Compósitos**

Em termos gerais, um material compósito pode ser definido como um material multifase exibindo uma combinação de resultados que o torna superior a cada fase de sua composição de modo que suas propriedades finais sejam melhores do que às dos seus materiais constituintes. O conceito de compósitos não foi inventado pelos seres humanos, eles são encontrados na natureza. Um exemplo é a madeira que é um compósito de fibras de celulose em uma matriz de lignina. O casco dos invertebrados, como os caracóis e ostras também é um exemplo de compósito (BARUD, 2006).

Hoje em dia, os materiais compósitos são amplamente utilizados para variados fins, devido às suas melhores propriedades mecânicas e térmicas quando comparados a materiais comuns. Além disso, a maioria dos compósitos atualmente disponíveis no mercado é feita usando materiais poliméricos não degradáveis e/ou derivados do petróleo. A crescente consciência ambiental global, a alta taxa de redução dos recursos petrolíferos e os conceitos de sustentabilidade, em conjunto, causaram a busca por novos produtos e processos que sejam ecologicamente corretos (SOMSUB; AHT-ONG, 2012).

Os materiais que constituem um compósito dividem-se em duas categorias principais: matriz e reforço. Os reforços podem ser fibras, partículas, e as matrizes podem ser polímeros, cerâmicas e metais. As fibras podem ser contínuas, longas ou curtas. Compósitos obtidos através de matrizes poliméricas são mais comuns e largamente usados em várias indústrias. Neste contexto, polímeros orgânicos apresentam propriedades especiais como: flexibilidade, baixa densidade, alta dureza, excelente propriedades mecânicas e ópticas tais como: transparência e índice de refração elevado. Portanto são matrizes adequadas para o preparo de novos compósitos.

### 3.6.1. Compósito de Celulose Bacteriana e Hidroxiapatita (CB-HA)

O objetivo principal de se produzir um compósito é a obtenção de um sistema com propriedades superiores às dos componentes unitários. Algumas limitações associadas aos polímeros, por exemplo, podem ser superadas pelo emprego de seus compósitos, dependendo da aplicação (ULISLAM *et al.*, 2014).

Compósitos bioativos envolvem geralmente a matriz – que confere propriedades mecânicas, físicas e químicas ao implante – e uma fase bioativa – que assegura a interação favorável entre implante e tecido vivo através da interface, adesão e proliferação celular. Um exemplo importante é o tecido ósseo. Como se sabe, a matriz óssea é constituída por uma parte orgânica (composta na sua grande maioria por colágeno) e uma parte inorgânica, cuja composição é dada basicamente por íons de fosfato e cálcio, formando cristais de hidroxiapatita (HUTCHENS *et al.*, 2006). Por conta disso, a fabricação de compósitos baseados em apatitas e uma matriz orgânica (*apatite-organic polymer composites*) tem sido a base para o desenvolvimento de biomateriais a serem utilizados em substituições ósseas.

Compósitos de matriz polimérica proporcionam ductilidade e outras propriedades necessárias à substituição óssea, contendo partículas de componente bioativo, que promovem a adesão e proliferação celular a partir da superfície do implante. São, portanto, uma escolha natural para substituir osso (TURRER; FERREIRA, 2008). Várias tentativas foram realizadas no intuito de usar polímeros naturais como matriz orgânica, tais como: quitosana, quitina, gelatina e o próprio colágeno (ANGELE *et al.*, 2004; SOSNIK *et al.*, 2005). Seguindo essa tendência, dois trabalhos, publicados em 2006 pelo mesmo grupo de pesquisadores (HONG *et al.*, 2006; WAN *et al.*, 2006), introduziram a celulose bacteriana nesse rol de possibilidades. Embora Svensson *et al.* (2005) já houvessem destacado a celulose bacteriana como material promissor para *scaffolds* na engenharia de tecidos, até então, nenhum estudo sobre a combinação de HA com CB havia sido relatado.

Os dois trabalhos apresentaram a celulose bacteriana como um novo substrato polimérico para a preparação de compósitos CB-HA em fluido corporal simulado (SBF), exibindo a caracterização dos compostos resultantes.

De forma intercomplementar, eles ressaltam as qualidades da celulose bem como suas aplicações mais gerais. Também há destaque para a aplicação potencial da celulose em substituição ao colágeno, no que diz respeito à preparação de compósitos com hidroxiapatita, tendo em vista que colágeno apresenta alguns problemas práticos como alto custo e dificuldade no controle de infecções.

Basicamente, os trabalhos apenas divergem quanto à técnica empregada para a modificação superficial da celulose, necessária para estimular a formação de apatita na sua superfície. No primeiro, a CB foi quimicamente modificada por simples tratamento com solução 0,1 mol/L de  $\text{CaCl}_2$  a 37°C e, em seguida, imersa em fluido corporal simulado, no qual ocorreu a mineralização biomimética ou, como alguns autores preferem, a precipitação biomimética. No segundo, as fibras foram inicialmente fosforiladas, para só então serem tratadas com  $\text{CaCl}_2$  e imersas em SBF. Nos anos que se seguiram, métodos alternativos de obtenção dos compósitos passaram a ser apresentados.

Um material nanocompósito formado por redes de celulose bacteriana e pós de hidroxiapatita cálcio-deficiente foi sintetizado e caracterizado (GRANDE *et al.*, 2009). O estudo teve como meta a fabricação de nanocompósitos de CB-HA pela formação de nanofibras de celulose na presença de uma fase mineral em cultura estática. As nanopartículas de HA foram previamente preparadas por precipitação química em via úmida, a partir de soluções aquosas de nitrato de cálcio e de sais de diaminofosfato. A fim de suspender as nanopartículas de HA, os meios de cultura foram modificados pela adição de carboximetilcelulose (CMC). Os compósitos foram preparados introduzindo-se CMC no meio de cultura da bactéria, antes da adição das nanopartículas de HA, que se mantiveram em suspensão no meio à medida que ocorria a formação das nanofibras de celulose. A CMC aumenta a viscosidade do meio de cultura e melhora a capacidade da solução em reter as partículas de HA em suspensão, evitando que as partículas precipitem antes da formação do hidrogel celulósico. A biocompatibilidade e a viabilidade de células nos nanocompósitos obtidos foram confirmadas pela cultura de células embrionárias de rim humano (HEK), fatores que fazem deste nanocompósito um material com potencial para aplicações biomédicas.

Com a introdução de um tratamento alcalino para otimizar o processo de mineralização biomimético, Shi *et al.* (2009) sintetizaram nanocompósitos de hidroxiapatita cálcio-deficiente e celulose bacteriana em uma rede 3D de nanofibras de celulose. Um novo mecanismo de formação de cristais ao longo das fibras de celulose foi descrito.

A biominalização é um processo natural para a formação de ossos e dentes em seres humanos e animais. O chamado método biomimético para recobrimento de materiais com fosfato de cálcio é inspirado por esse processo e consiste na formação de uma camada biologicamente ativa de apatita sobre uma superfície através da imersão desta em uma solução artificial supersaturada de cálcio e fosfato (LIU *et al.*, 2002).

Zimmermann *et al.* (2011) também descreveram a síntese de nanocompósitos de celulose bacteriana/hidroxiapatita para aplicações de tratamento ósseo usando uma abordagem biomimética. No entanto, celulose bacteriana, com várias morfologias superficiais (películas e tubos), foi carregada negativamente - através da adsorção de carboximetilcelulose - visando à nucleação de hidroxiapatita deficiente em cálcio (cdHA). A hidroxiapatita se destina a promover a formação óssea em defeitos, proporcionar rigidez e ser substituída ao longo do tempo à medida que novas formas de osso ocupam o seu lugar. A cdHA foi preparada *in vitro* em fluido corporal simulado, durante um período de uma semana. A quantidade de cdHA observada variou entre as diferentes amostras. Observou-se que o tamanho dos cristais de cdHA aumentou com o aumento da densidade das fibrilas de nanocelulose. Para determinar a viabilidade dos *scaffolds* *in vitro*, a morfologia e a diferenciação de células osteoprogenitoras foram analisadas usando microscopia de fluorescência e expressão dos genes de fosfatase alcalina. A presença de cristais de cdHA na superfície da celulose resultou num aumento da adesão celular.

Para aplicações na área de engenharia de tecidos ósseos é necessária uma estrutura de poros microscópicos para facilitar o ingresso de osteoblastos e a formação de um tecido mineralizado (SILVA, 2012). Zaborowska e colaboradores (2010) incorporaram microesferas de parafina ao meio de cultura do microorganismo *G. hansenii* visando à obtenção de *scaffolds*. Posteriormente, a parafina foi removida. No *scaffold* de CB

microporoso e nanoporoso (controle) foram cultivadas células osteoprogenitores MC3T3-E1. A nova configuração melhorou a penetração das células no *scaffold* e a viabilidade celular na membrana de CB. Esse estudo mostrou que a CB microporosa é um biomaterial atraente como um *scaffold* para aplicações em regeneração óssea.

Com a consolidação das técnicas de preparo e obtenção dos compósitos de celulose e hidroxiapatita, novas investigações passaram a ser realizadas visando a avaliar o comportamento destes materiais em meios biológicos. Características como biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*, bioatividade e comportamento osteogênico tornaram-se foco de investigação. Em um destes trabalhos, Saska e colaboradores (2011) desenvolveram membranas de CB-HA para regeneração óssea e estudaram suas propriedades biológicas. Os testes *in vivo*, realizados em defeitos ósseos não críticos em tibias de ratos, não mostraram reação inflamatória. Após quatro semanas, os defeitos ósseos foram completamente preenchidos pelo novo tecido ósseo, comprovando a eficiência das membranas CB-HA em aplicações para regeneração óssea.

Tazi *et al.* (2012) estudaram a viabilidade da celulose bacteriana como *scaffold* para o crescimento de osteoblastos e formação de osso. A CB foi obtida a partir de uma cultura de *Acetobacter xylinum* em meio suplementado com hidroxiapatita para favorecer a formação do compósito. As membranas foram ainda usadas para avaliar o crescimento de osteoblastos, atividade fosfatase alcalina e a formação de nódulos de osso. A cultura de osteoblastos mostrou que a película de CB por si só não apresenta toxicidade e pode sustentar a adesão de osteoblastos. Além disso, o crescimento e a adesão de osteoblastos foram significativamente melhorados nos compósitos quando comparados à película pura. Tanto película pura como compósitos melhoraram a osteocondutividade, confirmada pelo nível de atividade de fosfatase alcalina. Os compósitos também apresentaram maior formação de nódulos e mineralização do que as membranas de CB isoladas. Por fim, o trabalho demonstrou que tanto películas puras de CB como compósitos de CB-HA podem ser úteis em aplicações da engenharia de tecido ósseo.

Para a formação de compósitos à base de celulose bacteriana e hidroxiapatita, têm sido propostas duas vias principais (UI-ISLAM *et al.*, 2014).

A primeira envolve a adição de pós de hidroxiapatita ao meio de fermentação de modo que a hidroxiapatita seja incorporada à celulose na medida em que ela é formada. No entanto, como as apatitas tendem a sedimentar, é necessário o uso de um agente auxiliar a fim de manter as partículas suspensas numa condição homogênea. Em geral, emprega-se carboximetilcelulose – CMC – para este fim. Deste modo, ocorre a incorporação *in situ* da hidroxiapatita no hidrogel formado. Segundo a literatura, a adição de CMC durante a formação da celulose também aumenta sua capacidade de retenção de água (MORMINO, 2002). A segunda via envolve a proposta apresentada por Hutchens e colaboradores (2006) segundo a qual CB é incubada em solução de hidrogeno fosfato de sódio e em cloreto de cálcio. Este método parte de uma película de celulose já formada e devidamente purificada mediante técnica apropriada (PINEDA; MESA; HABERT, 2010).

Vale salientar que no método *in situ*, é possível especificar a estequiometria da hidroxiapatita a ser incorporada. Porém, é preciso definir as concentrações ideais de HA e CMC a serem empregadas, de modo que a adição destes dois não comprometa a cinética de formação do hidrogel no meio considerado. Na técnica de Hutchens (2006), não existe este controle, sendo obtida hidroxiapatita cálcio-deficiente.

Hidroxiapatita deficiente em cálcio pode ser usada como precursor do componente inorgânico da hidroxiapatita biológica (VALLET-REGI; RODRIGUEZ-LORENZO; SALINAS, 1997), uma vez que a formação de HA envolve uma nucleação inicial com subsequente crescimento de cristais (HONG *et al.*, 2006). Estudos sobre o crescimento de cristais sugerem que a nucleação ocorre nas superfícies que expõem padrões repetitivos de grupos aniónicos. Estes grupos aniónicos tendem a concentrar os cátions inorgânicos criando um ambiente supersaturado, promovendo dessa forma a nucleação orientada dos cristais (HARTGERINK; BENIASH; STUPP, 2001). Inserida neste contexto, a celulose possui na sua cadeia grupos aniónicos OH<sup>-</sup> (hidroxilas com cargas negativas) livres que permitem a ligação do Ca<sup>++</sup> numa solução ácida de CaCl<sub>2</sub>. Deste modo, o cálcio pode se ligar ao fósforo para formar o fosfato de cálcio (HUTCHENS *et al.*, 2006).

Há ainda algumas rotas alternativas, como a que consiste em um pré-tratamento da membrana com Ca(OH)<sub>2</sub> ou CaCl<sub>2</sub>, seguido de imersão em

solução de SBF, de modo a favorecer a formação de HA na sua superfície (SASKA *et al.*, 2011).

### **3.7. Estudo *in Vitro***

A celulose bacteriana tem se mostrado um biomaterial de grande potencial para uso em medicina regenerativa e outras aplicações em engenharia tecidual. As aplicações nessas áreas se devem às suas características e propriedades, tais como: alta cristalinidade, porosidade, biocompatibilidade, atoxicidade e biodegradabilidade. Por essas propriedades, a CB está sendo utilizada em pesquisas de regeneração de cartilagens, vasos artificiais e em engenharia de tecidos ósseos (OLIVEIRA; RAMBO; PORTO, 2013). Alguns pesquisadores utilizaram a celulose bacteriana como biomaterial base para a fabricação de *scaffolds* adequados para aplicações em engenharia de tecidos (HUANG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2009). Entretanto, qualquer biomaterial a ser implantado para testes *in vivo* deve ter sua origem e composição conhecidas para se evitar danos ao organismo, seja através de caracterização físico-química, estudos de biocompatibilidade com tecidos vivos e/ou testes *in vitro* (OLIVEIRA; RAMBO; PORTO, 2013).

Os ensaios *in vitro* são normalmente efetuados como testes iniciais na primeira fase da avaliação da biocompatibilidade de um material. O termo biocompatibilidade envolve dois fenômenos associados, de modo que: o implante do material não pode ser afetado pelo meio fisiológico (corrosão, degradação) e o tecido local não pode sofrer danos pela presença do material (necroses, reações celulares, infecções pela ação de bactérias) (RATNER, 1996). A avaliação *in vitro* possibilita a obtenção de um resultado rápido e de baixo custo, além de minimizar o uso de animais em pesquisa (RATNER, 1996).

Além dos ensaios de biocompatibilidade, podem ser realizados testes de citotoxicidade. Tais testes fazem uso de técnicas *in vitro* para identificar efeitos adversos que os materiais ou dispositivos médicos possam acarretar às células, tornando-os impróprios para uso como biomateriais. Esses ensaios utilizam cultura celular, envolvendo técnicas que determinam a lise das

células (ou morte celular), a inibição de crescimento celular e outros efeitos causados nas células pelos artefatos, materiais e/ou seus extratos. Portanto, para ser aprovado em um teste de citotoxicidade *in vitro*, um material não deve causar a morte das células nem afetar suas funções celulares (ALMEIDA, 2000).

### **3.7.1. Estudo de Degradação *in Vitro* dos Materiais Compósitos**

Além da caracterização do biomaterial, é importante que sejam também conhecidos seu tempo de degradação, os produtos da degradação e os efeitos desses no organismo (OLIVEIRA; RAMBO; PORTO, 2013). Para os compósitos CB-HA, especificamente, procura-se verificar se a apatita depositada não se “desprenderá” da matriz celulósica quando o compósito for inserido no meio fisiológico. Este tipo de estudo é normalmente realizado pela colocação de amostras com tamanhos e massas definidos em soluções de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) ou SBF (*Simulated Body Fluid*), deixados em incubadora a 37°C, durante tempo pré-determinado.

### **3.7.2. Bioatividade**

O requisito essencial para um material artificial se ligar ao osso vivo é a formação de apatita na sua superfície quando implantando no organismo vivo (KOKUBO, 1991; KOKUBO; TAKADAMA, 2006). Em 1990, Abe *et al.* propuseram método de recobrimento de materiais bioinertes em solução similar ao fluido corpóreo acelular com o objetivo de mimetizar o processo de formação de apatitas biológicas (método biomimético). O tratamento biomimético de superfície se baseia na precipitação heterogênea de fosfatos de cálcio – tais como a hidroxiapatita – sobre os substratos de interesse. Essa deposição da camada de apatita aumenta a osseocondutividade e potencializa o processo de osseointegração do material implantado, melhorando a qualidade da interface osso-implante, principalmente nos períodos iniciais da cicatrização (ALVES-REZENDE *et al.*, 2011).

Em geral, a capacidade de ligação de um material com o osso é avaliada examinando a capacidade de formação de apatita sobre sua superfície quando imerso em fluido corporal simulado, que contém concentrações iônicas aproximadamente iguais às do plasma sanguíneo humano. Todo material que em SBF seja capaz de formar apatita na sua superfície também é capaz de ligar-se ao osso vivo através da camada de apatita formada, desde que o material não contenha qualquer substância que induza reações tóxicas ou de anticorpos (KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

A análise da formação de apatita sobre um material, tal qual celulose bacteriana e seus compósitos, em SBF é útil não apenas para predizer a bioatividade do material *in vivo*, seja do ponto de vista qualitativo como quantitativo, como também permitir que o número de animais utilizados e a duração das experiências com eles possam ser consideravelmente reduzidos (KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

### **3.7.3. Adsorção de Proteína**

O estudo quantitativo do fenômeno da adsorção de proteínas na superfície de biomateriais é de grande importância, uma vez que a adsorção de proteínas plasmáticas é um dos primeiros eventos que ocorre quando um biomaterial entra em contato com o sangue (NOGUEIRA, 1999). A adsorção de proteínas é um processo complexo, envolvendo ligações de van der Waals, ligações de hidrogênio e ainda interações eletroestáticas, sendo dependente das características físicas e químicas da superfície onde a adsorção irá ocorrer (NUNES, 2012). Além disso, ela está diretamente relacionada à biocompatibilidade, sendo que o desempenho de materiais sintéticos em contato com o sangue dependerá, principalmente, da camada de proteína adsorvida, porque é esta camada a mediadora das interações entre os biomateriais e os componentes do sistema biológico (NOGUEIRA, 1999).

O estudo de adsorção de proteínas objetiva a determinação da quantidade de proteína adsorvida em uma unidade de área a uma dada concentração desta proteína em solução. É possível utilizar um modelo bastante simples, baseado em uma curva de calibração. No presente estudo,

optou-se por trabalhar com a Albumina do Soro Bovino (BSA), uma proteína globular largamente utilizada como proteína modelo nos estudos de adsorção em diversas superfícies (NUNES, 2012). A escolha da albumina como proteína de estudo deve-se à sua importância no organismo humano, uma vez que possui inúmeras funções fisiológicas importantes, como controle da pressão osmótica e transporte de ácidos graxos livres no sangue (NOGUEIRA, 1999), sendo ainda a proteína em maior concentração no plasma humano, representando 60% das proteínas totais no plasma (NUNES, 2012; SILVA, 2008). Além disso, a BSA é uma proteína de custo acessível, quando comparada a outras proteínas, como, por exemplo, a proteína A/G, utilizada em muitos ensaios de separação e purificação com membranas de afinidade.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Micro-organismo

*G. hansenii* ATCC 23769, adquirida da Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello (código CCT 1431), foi crescida e mantida em meio de cultura HS (HESTRIN; SCHRAMM, 1954).

A bactéria foi inoculada em caldo HS e incubada a 30°C/48h até a formação de uma película na superfície do meio. Alíquota de 0,1mL da cultura foi estriada em placa de Agar HS e incubada a 30°C/48h. Uma alçada da cultura foi inoculada em Agar HS inclinado e incubada a 30°C/48h e mantida sob refrigeração (4-5°C). A partir da cultura da placa também foi preparada uma suspensão espessa de células em 0,7mL de caldo HS adicionado de 25% (v/v) de glicerol (80% v/v). Os tubos foram armazenados a -18°C e -80°C.

#### 4.1.2. Meios de Cultura e Substratos Agroindustriais

O inóculo de *G. hansenii* foi obtido a partir da cultura mantida sob refrigeração, a qual foi crescida em caldo HS e incubada a 30°C/48h. Alíquotas de 3% (v/v) dessa cultura foram adicionadas aos meios sintéticos (ALABAN e *Hestrin & Schramm*, aqui denominado HS), e aos substratos (sucos de caju e resíduo líquido de sisal).

A composição do meio ALABAN foi: 100 g·L<sup>-1</sup> de sacarose, 5 g·L<sup>-1</sup> de fosfato ácido de potássio, 2,5 g·L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 0,6 g·L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio e 0,2 g·L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio heptahidratado (ALABAN, 1962).

A composição do meio HS foi: 20 g·L<sup>-1</sup> de glicose, 5 g·L<sup>-1</sup> de peptona, 5 g·L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 2,7 g·L<sup>-1</sup> de fosfato bibásico de sódio anidro e 1,15 g·L<sup>-1</sup> de ácido cítrico monohidratado (HESTRIN; SCHRAMM, 1954).

O resíduo líquido de sisal congelado foi fornecido pela Embrapa Algodão (Campina Grande – PB) e mantido em câmara fria a -5°C a fim de preservar suas propriedades e evitar fermentação indesejada. Apenas para fins de utilização imediata, o mesmo era descongelado sob refrigeração. Para a utilização como meio de fermentação, realizou-se filtração simples e autoclavagem a 120°C durante 15 min.

O suco de caju foi obtido a partir de uma mistura de pedúnculos de diversos clones de cajueiro (CCP 76; CCP 09; BRS 189, dentre outros) provenientes do Campo Experimental da Embrapa Agroindústria Tropical, localizado em Pacajus – CE. O suco de caju foi mantido em câmara fria a -5°C. As amostras foram descongeladas apenas para fins de caracterização e preparo dos meios para fermentação. O material foi filtrado e esterilizado como descrito anteriormente.

#### **4.1.3. Precursors da Hidroxiapatita**

Os reagentes usados para síntese de hidroxiapatita em solução foram cloreto de cálcio – CaCl<sub>2</sub> (ref. C1016-500g) e fosfato de sódio dibásico – Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (ref. S5136-1Kg), ambos da Sigma-Aldrich.

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Caracterização dos Resíduos Agroindustriais

#### Acidez e pH

Para a análise de acidez dos resíduos, procedeu-se à titulação com hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) 0,1mol/L, empregando-se titulador automático digital modelo HI-901. Três leituras de cada amostra foram realizadas, sendo o resultado expresso em porcentagem de ácido málico.

Para a determinação de pH, empregou-se pHmetro digital previamente calibrado. Realizaram-se três leituras por substância, a fim de se obter um valor médio, sendo o eletrodo lavado com água destilada nos intervalos.

Determinou-se o pH inicial de todos os meios trabalhados.

#### Refratometria na Escala Brix

As amostras foram aplicadas diretamente a um refratômetro digital na temperatura de 25°C para realização das leituras.

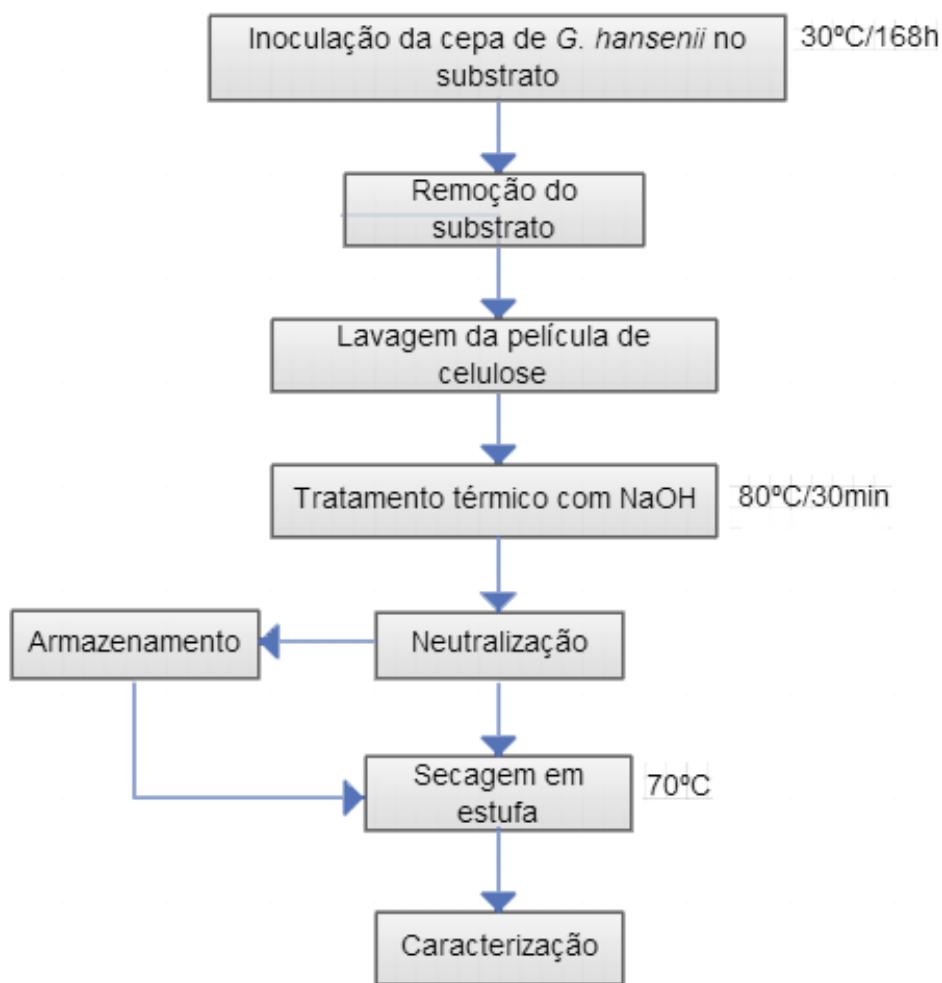
### 4.2.2. Obtenção e Purificação da Película de Celulose Bacteriana

Os primeiros testes de inoculação do micro-organismo *Gluconacetobacter hansenii* foram realizados em tubos de ensaio empregando-se o meio ALABAN (1962). Uma vez observada a formação da película neste meio, seguiram-se os testes nos substratos de interesse, suco de caju e resíduo líquido de sisal.

Com base na literatura (KESHK *et al.*, 2005; PÉRTILE, 2007; PINEDA; MESA; HABERT, 2010; RECOUVREUX, 2008; SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004) e em testes preliminares, que incluíram o monitoramento da densidade ótica e do pH dos meios de cultivo (APÊNDICE A), adotou-se um protocolo padronizado de obtenção e purificação de CB visando evitar possíveis alterações nas suas propriedades. Manteve-se o pH inicial dos meios de cultura (substratos), por já apresentarem naturalmente caráter ácido favorável ao crescimento do micro-organismo *G. hansenii* (CCT 1431). Os substratos foram inoculados com 3% de inóculo (v/v) e, posteriormente, mantidos à

temperatura de 30°C por pelo menos 168h, em cultivo estático. Para a remoção da película formada, realizaram-se lavagens sucessivas com dodecil sulfato de sódio 2% (SDS) e tratamento térmico com hidróxido de sódio 1 mol/L à temperatura de 80°C por 30min. Por fim, a biocelulose foi neutralizada e submetida à secagem (FLUXOGRAMA 1).

Fluxograma I - Protocolo de obtenção e purificação da película de celulose bacteriana



Fonte: Elaborada pelo autor

Para fins de caracterização, considerou-se como última etapa de tratamento a secagem em estufa (70°C) visando à obtenção de biofilmes e compósitos devidamente secos e sem qualquer umidade residual.

#### **4.2.3. Obtenção dos Compósitos CB-HA**

O compósito de celulose bacteriana e hidroxiapatita foi preparado por meio de duas técnicas. A primeira envolveu a adição dos pós de hidroxiapatita *in situ*, isto é, ao substrato recém-inoculado, de modo que a celulose formou-se na presença do biomaterial cerâmico. A segunda, adaptada de Hutchens (2006), consistiu na deposição da apatita à película já formada e devidamente purificada.

Para o teste *in situ*, foram preparadas formulações com 1% de hidroxiapatita (m/V) e concentrações distintas de CMC: 1,5; 2,0; 2,5%. Também foi preparada uma película sem adição de CMC para fins de controle e comparação.

Para a segunda técnica foi utilizado um protocolo baseado no proposto por Hutchens *et al.* (2006), segundo a adoção de ciclos de imersão, de 24h cada, em soluções de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$  – 11 g.L<sup>-1</sup>) e fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 8,52 g.L<sup>-1</sup>), à temperatura ambiente. Inicialmente, as películas de CB foram imersas por 24 horas em solução de  $\text{CaCl}_2$ . Subsequentemente, as amostras foram lavadas com água destilada e novamente imersas por mais 24 horas, sob as mesmas condições, em solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Este processo sequencial de imersão em solução de  $\text{CaCl}_2$  e de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  visou à formação de HA sobre a CB e foi denominado ciclo de HA. Foram realizados seis ciclos de HA.

#### **4.2.4. Caracterização dos Materiais Obtidos (CB e CB-HA)**

##### Análise Termogravimétria (ATG)

A análise foi realizada em um analisador termogravimétrico Shimadzu, modelo TGA STA 6000, conduzida sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 40 mL/min, razão de aquecimento de 10°C/min e temperatura final de 700°C. Procurou-se uniformizar as massas das amostras trabalhadas para valores compreendidos entre 5-7 mg.

### Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises de calorimetria exploratória diferencial foram obtidas utilizando-se um equipamento DSC Q20 dpUnion com as seguintes condições: atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min, razão de aquecimento de 20°C/min e temperatura final de 400°C. Procurou-se uniformizar as massas das amostras trabalhadas para valores próximos a 5 mg.

### Difração de Raios X (DRX)

Os difratogramas de Raios X foram obtidos no difratômetro da marca Rigaku modelo DMAXB, empregando-se tubo de cobre. O intervalo angular (em 2θ) utilizado foi de 10 a 70° com uma velocidade de varredura de 0,5°/min.

Calculou-se a cristalinidade da celulose de acordo com a Equação (5):

$$\text{Cristalinidade( \% )} = \left( \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) \times 100 \quad (5)$$

em que:

$I_{002}$  – intensidade da celulose cristalina em  $2\theta \sim 23^\circ$ ;

$I_{am}$  – intensidade da celulose amorfa em  $2\theta \sim 17^\circ$ .

Este método, desenvolvido por Segal e colaboradores (1959), tem sido largamente utilizado para o cálculo da cristalinidade da celulose.

Os difratogramas obtidos foram comparados a padrões encontrados na literatura através do banco de dados JCPDS, com auxílio do programa *X-Pert Highscore 1.0*.

### Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no espectrômetro Nicolet 800 associado a uma célula MTech PAS, após o preparo das amostras com KBr pulverizado, sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T) com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, na faixa de absorção de 4000-400 cm<sup>-1</sup>.

### Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise microscópica, os biofilmes foram mantidos secos em estufa a 70°C. Todas as amostras foram colocadas cuidadosamente em suportes metálicos, com a ajuda de uma fita de dupla face de carbono a fim de melhorar a condução. Por fim, procedeu-se a metalização, ou seja, a deposição de uma camada de ouro de aproximadamente 30 nm de espessura, também condutora, por *sputtering*, empregando-se um metalizador da marca Emitech, modelo K650.

As fotomicrografias foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura modelo Zeiss DSM-940A, a 30 keV em um modo de imagem secundária de elétrons (SEI).

Para determinação da espessura das fibras de celulose bacteriana, as micrografias foram analisadas através do ImageJ, programa de domínio público desenvolvido pelo *National Institute of Health*, NIH, Estados Unidos. Realizaram-se aproximadamente 50 medições considerando-se fibras aleatórias de cada imagem.

### Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Empregou-se EDS, uma técnica de análise de superfície, para determinação da razão carbono/oxigênio das películas purificadas de celulose bacteriana e da razão cálcio/fósforo dos depósitos de hidroxiapatita sobre as mesmas.

### Determinação da Espessura

A espessura das películas de celulose pura e dos compósitos CB-HA foi obtida pela média das medidas tomadas em pelo menos cinco pontos aleatórios de cada amostra, utilizando micrômetro QuantuMike IP65 (Mitutoyo; 0-25 mm).

Empregaram-se apenas amostras secas.

### Ensaios Mecânicos

Antes da realização dos testes mecânicos, os filmes secos foram acondicionados por dois dias em ambiente climatizado a 24°C e umidade relativa de 50-55% (solução saturada de nitrato de magnésio), a fim de evitar que a água absorvida pelos filmes pudesse agir como agente plastificante e modificar suas propriedades mecânicas (MEIRA, 2012). As espessuras dos filmes foram medidas

(precisão de 1 $\mu$ m) usando um micrômetro digital QuantuMike IP65 (Mitutoyo Co., Japão) em cinco pontos diferentes da amostra.

Para determinar as propriedades mecânicas das películas puras de celulose e materiais compósitos foram realizados testes de tração (ensaios de tensão e deformação na ruptura) em uma máquina de ensaio universal EMIC modelo DL3000. A metodologia utilizada foi baseada na norma ASTM D882 para filmes finos. As amostras foram cortadas em dimensões de 12,6 cm por 1,2 cm e ajustadas às garras do equipamento, cuja separação inicial (*grip separation*) foi fixada em 10 cm. A velocidade de tração foi de 12,5 mm/min e a célula de carga empregada de 500N ou 50 kgf. Cinco amostras para cada teste foram avaliadas.

#### **4.2.5. Estudo in Vitro**

##### Estudo de Degradação in Vitro dos Materiais Compósitos

Com vistas a potenciais aplicações em engenharia de tecido ósseo, estudou-se a degradação *in vitro* do compósito CB-HA. A degradação foi avaliada através da medição da variação de massa, que seria atribuída à perda de apatita pelo material.

Amostras quadradas de 1 cm de lado foram imersas em 0,1 mol/L de solução salina – *phosphate buffered saline* (PBS) – no pH de 7,25 e mantidas em incubadora a 37°C. Todos os compósitos foram inicialmente lavados, para remoção de excesso dos meios e partículas fracamente unidas, secos em estufa, pesados e colocados na solução salina, durante o período de 30 dias. Após este tempo, os materiais foram novamente lavados com água deionizada, secos e pesados.

Trabalhou-se com amostras em triplicata e, ao final do teste, realizou-se um tratamento estatístico para verificar se havia diferença significativa entre os valores de massa tomados antes e após a realização do experimento. As massas determinadas para cada amostra (triplicata) e as médias, juntamente com os desvios-padrão foram registrados. Os grupos foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) e um valor de  $p \leq 0,05$  foi adotado para indicar diferenças estatisticamente significativas.

### Bioatividade

A realização do teste de bioatividade seguiu os passos abaixo:

- (1) Volumes iguais das soluções A e B (TABELA 1) foram armazenados separadamente, em tubos *falcon*, hermeticamente fechados, e acondicionados a 37°C em incubadora.

O volume necessário de SBF foi calculado através da Equação (6) (KOKUBO; TAKADAMA, 2006):

$$Vs = Sa/10 \quad (6)$$

Nessa equação, Vs é o volume de SBF (mL) e Sa a área superficial do espécime ( $\text{mm}^2$ ).

- (2) Preparou-se outro tubo *falcon* com a amostra do material a ser testado.
- (3) Procurou-se injetar simultaneamente o conteúdo das soluções A e B no tubo *falcon* contendo a amostra para, em seguida, colocá-lo na incubadora a 37°C por um período de 14 dias.

Como a mistura sucessiva de reagentes sólidos sob agitação a 37°C envolve o risco de precipitação prematura da hidroxiapatita, um modo alternativo para a preparação de soluções de SBF foi adotado segundo metodologia proposta por Bohner e Lemaitre (2009), a qual consistiu em preparar previamente duas soluções A e B de reserva (ALVES-REZENDE *et al.*, 2011). O preparo da solução A envolveu todos os reagentes sólidos, à exceção de  $\text{CaCl}_2$ , mais metade da solução de HCl prescrita, ao passo que a solução B incorporou  $\text{CaCl}_2$  e a outra metade de HCl, conforme pode ser visto na TABELA 1.

Tabela 1 - Quantidades de reagentes requeridas para o preparo das soluções A e B

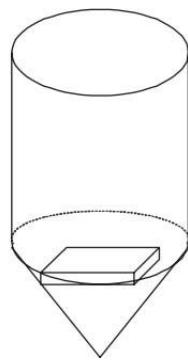
<b>Reagentes</b>	<b>Massas (g)</b>	
	<b>Solução A</b>	<b>Solução B</b>
NaCl	6,213	6,213
NaHCO <sub>3</sub>	5,948	
KCl	0,450	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,462	
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,622	
CaCl <sub>2</sub>		0,584
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,144	
Volumes de HCl (mL)		
HCl	0,850	0,850

Fonte: Elaborada pelo autor

Verificou-se, na solução resultante, transparência e ausência de cristais ou precipitados em suspensão, bem como depósitos de precipitado na superfície do recipiente, tendo em vista que SBF é uma solução supersaturada em relação à apatita e um método de preparação inapropriado pode levar a sua precipitação durante o ensaio.

Os espécimes (quadrados de 2 cm de lado) foram mantidos no SBF como mostrado na FIGURA 3, com o cuidado de mantê-los completamente submersos.

Figura 3 - Posicionamento das amostras no SBF



Fonte: Kokubo e Takadama (2006)

As amostras foram avaliadas segundo diferenças de massa tomadas antes e depois do experimento e através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), para se caracterizar as superfícies dos depósitos obtidos.

A quantidade percentual de apatita, depositada sobre a CB ( $m\%$ ) e sobre os compósitos, foi calculada a partir da Equação (7), em que as massas das amostras antes e após a realização dos experimentos foram representadas por  $m_i$  e  $m_f$ , respectivamente.

$$m\% = \frac{m_f - m_i}{m_i} \cdot 100 \quad (7)$$

### Adsorção de Proteínas

Neste trabalho estudou-se a adsorção, a 37°C, de albumina de soro bovino, BSA, (Albumin bovine fraction V, pH 7.0) ref. 11930 da Sigma, uma das macromoléculas presentes no líquido sinovial (SILVA, 2008), aos compósitos CB-HA.

Seguiu-se o procedimento abaixo.

- (1) Preparou-se PBS 0,5 mol/L com pH ajustado para 7,4;
- (2) Os compósitos foram pesados e postos em PBS por 24 h;
- (3) Para o teste de adsorção promoveu-se agitação branda do meio\* contendo o BSA de concentração conhecida e os compósitos já previamente pesados e tratados com PBS;
- (4) Após o experimento, realizado na temperatura de 37°C, removeram-se as amostras e determinou-se a quantidade de proteína adsorvida através da concentração remanescente de BSA (medição de absorbância a 272 nm). Antes do experimento as absorbâncias também foram tomadas e uma curva padrão foi traçada.
- (5) Os compósitos foram secos e pesados.

\*Para o preparo do meio, colocou-se, em 40 mL de PBS, 200 mg de amostra e 20 mg de BSA (0,5 g/L).

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Caracterização dos Resíduos Agroindustriais

Os valores de °Brix, pH e acidez para os diferentes meios de cultivo são apresentados na TABELA 2. Comparando-se ao meio padrão ALABAN, inicialmente empregado, e levando-se em conta de que a medida em °Brix guarda uma relação direta com o teor de açúcares, observou-se que tanto o suco de caju quanto o resíduo líquido de sisal apresentam teores próximos ao meio sintético, indicando potencial para serem utilizados pelo micro-organismo *Gluconacetobacter hansenii* como fonte alternativa de açúcar durante o processo fermentativo. Tanto o suco de caju quanto o resíduo líquido de sisal também apresentaram valores de pH próximos a 5, valor dentro da faixa considerada ótima (4-6) para o crescimento do *G. hansenii* (CHAWLA *et al.*, 2009).

Tabela 2 - Valores determinados de Brix, pH e acidez para os substratos estudados

Substrato	°Brix	pH	Acidez
ALABAN	10,4 ± 0,01	5,13 ± 0,02	0,85 ± 0,02
Caju	10,1 ± 0,01	4,84 ± 0,04	0,39 ± 0,04
Sisal	12,0 ± 0,02	4,82 ± 0,02	1,17 ± 0,01

Fonte: Elaborada pelo autor

Embora os valores de acidez tenham se mostrado distintos, principalmente em relação ao caju, tal diferença não afetou a qualidade dos resíduos como substratos para o crescimento do micro-organismo e consequente formação do biopolímero.

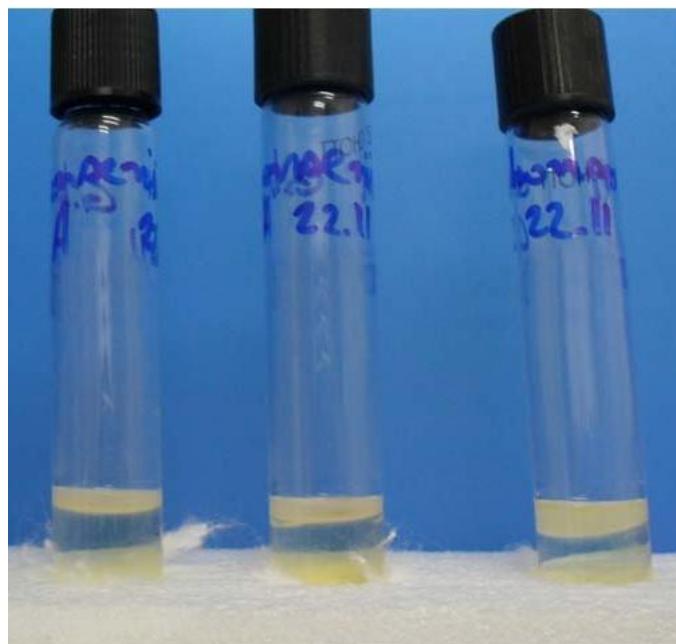
Esta etapa de caracterização proporcionou uma comparação preliminar dos resíduos trabalhados com o meio sintético utilizado como controle. Posteriormente, foi realizado um estudo complementar (LIMA, 2014) que enriqueceu as informações sobre a caracterização destes substratos (ANEXO A) e que permitiu avaliar a influência direta de parâmetros, como

concentração de açúcares, pH e suplementação com fontes de nitrogênio, na produção de CB.

## 5.2. Obtenção da Película de Celulose Bacteriana

A formação de película costuma ser evidenciada já no terceiro dia de incubação. No entanto, o tempo médio estipulado para remoção do meio e purificação da celulose bacteriana foi de sete dias, visando obter uma película mais resistente. As películas formadas podem ser observadas na imagem da FIGURA 4.

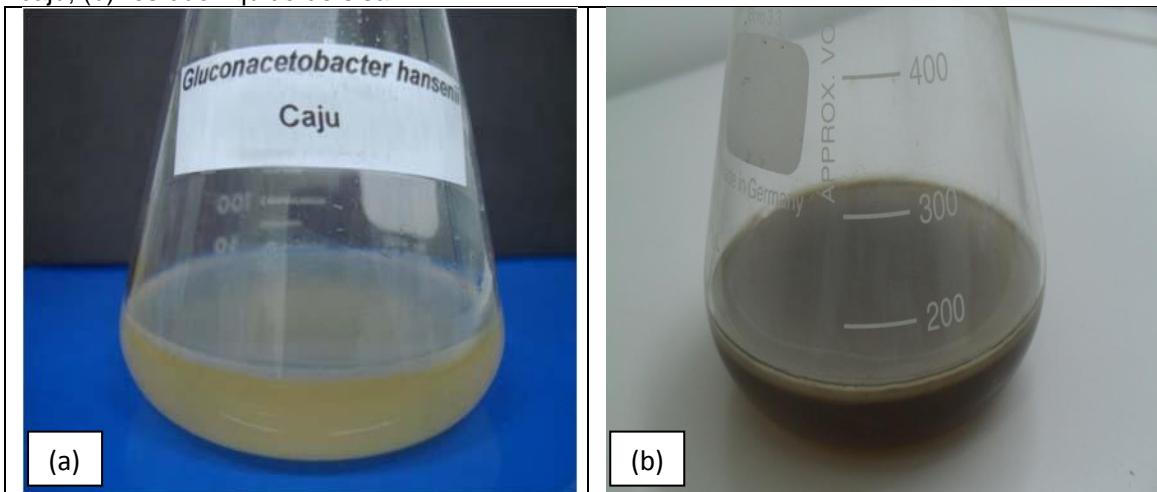
Figura 4 - Películas de celulose bacteriana obtidas após sete dias de cultivo em meio ALABAN



Fonte: Elaborada pelo autor

Posteriormente, Erlenmeyers passaram a ser empregados (FIGURA 5), mas sem qualquer modificação da técnica empregada com os tubos de ensaio. Manteve-se o tempo médio de sete dias para remoção e tratamento das películas de celulose.

Figura 5 - Películas de celulose bacteriana obtidas após sete dias de cultivo em (a) suco de caju; (b) resíduo líquido de sisal



Fonte: Elaborada pelo autor

A película, na sua forma natural, recém-extraída do meio de cultivo, não é adequada para caracterização. Por isso, adotam-se procedimentos de purificação e secagem visando à melhoria da cor, redução do odor orgânico – através da remoção de impurezas proteicas e micro-organismos – e facilidade de manuseio (GEORGE *et al.*, 2005). Estes procedimentos envolveram o tratamento térmico das celuloses com NaOH 1 mol/L, na temperatura de 80°C pelo período de 30 min, seguido de neutralização e secagem em estufa a 70°C.

O protocolo de purificação utilizado mostrou-se eficaz, levando à obtenção de películas sem quaisquer traços de contaminantes e resquícios dos meios. As películas purificadas apresentaram aspecto gelatinoso, resistência ao manuseio e translucidez (FIGURA 6).

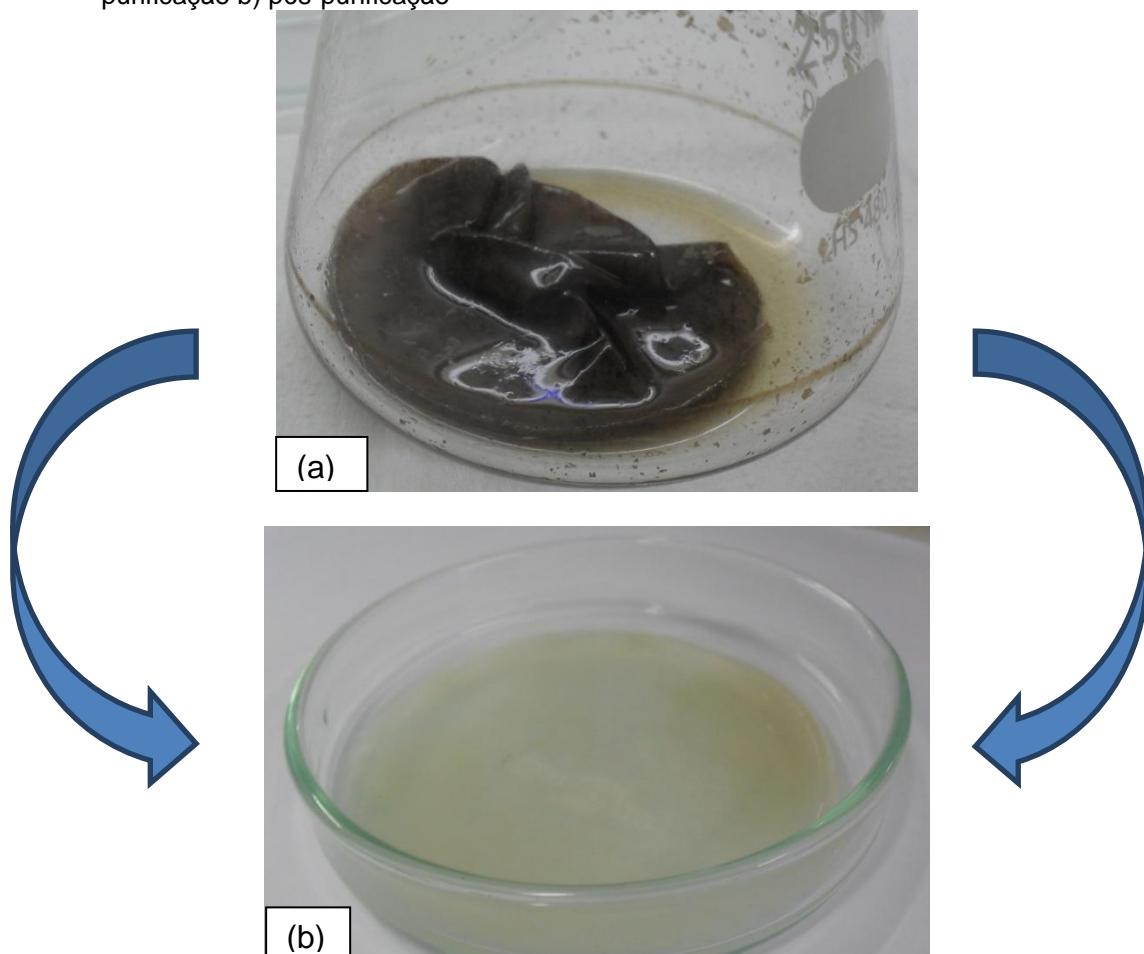
Figura 6 - Película de celulose bacteriana obtida em meio de cultivo ALABAN após etapa de purificação



Fonte: Elaborada pelo autor

Vale frisar que mesmo para as películas oriundas do resíduo líquido de sisal, que apresentam aspecto mais opaco e enegrecido, a purificação mostrou-se eficaz (FIGURA 7).

Figura 7 - Película de celulose bacteriana obtida em resíduo líquido de sisal a) pré-purificação b) pós-purificação

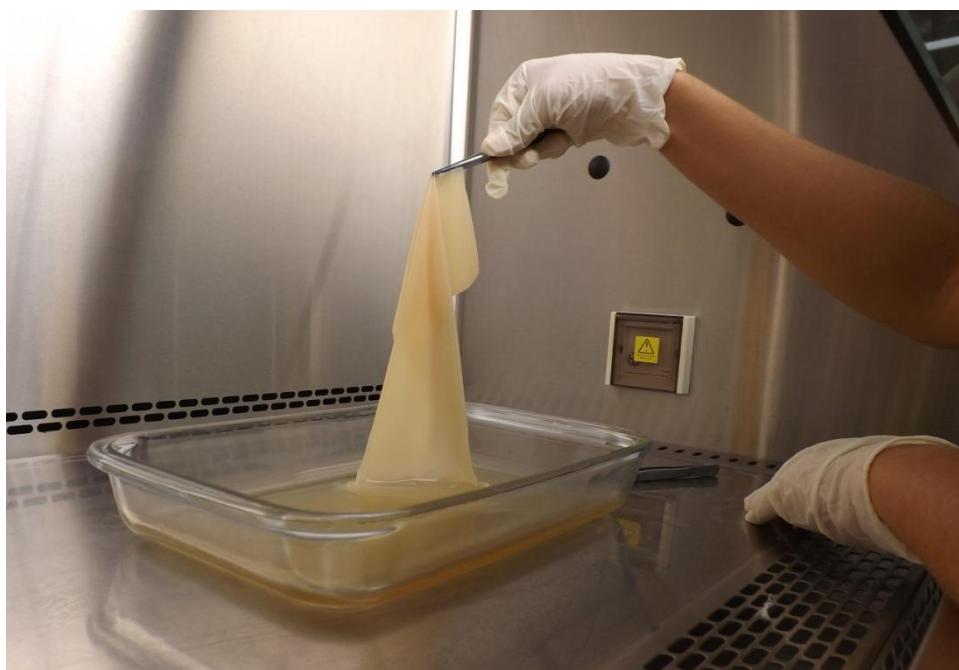


Fonte: Elaborada pelo autor

Embora a obtenção de CB tenha sido conseguida a partir do meio de cultura ALABAN, dados da literatura nos motivaram a adotar outro meio sintético conhecido como HS (HESTRIN; SCHRAMM, 1954). Diferente do ALABAN, o meio HS apresenta glicose na sua composição o que o torna mais interessante, pelo fato da glicose ser a principal fonte de carbono utilizada pelo *Gluconacetobacter hansenii* na produção de CB (CARREIRA *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2014; HUTCHENS, 2007;). Não é por acaso que, desde a descoberta da produção da celulose bacteriana, HS tem sido o meio sintético mais utilizado (GOTTSCHALK *et al.*, 2013).

No meio HS, foi possível realizar um pequeno aumento de escala passando-se a obter películas maiores (21x13 cm) como a que está representada na FIGURA 8.

Figura 8 - Película de celulose bacteriana obtida a partir do meio de composição definida (HS)



Fonte: Elaborada pelo autor

Posteriormente, este aumento de escala foi também direcionado às películas produzidas a partir dos resíduos agroindustriais (FIGURA 9).

Figura 9 - Celulose bacteriana obtida a partir de: a) suco de caju, b) resíduo líquido de sisal





Fonte: Elaborada pelo autor

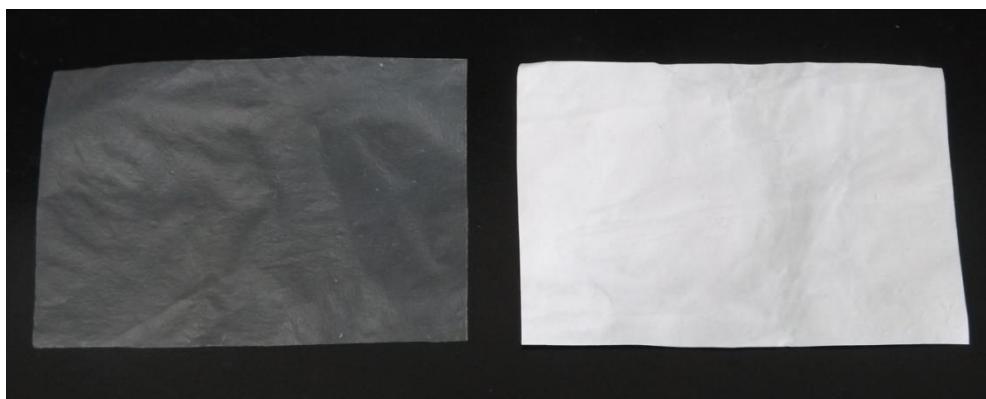
As películas obtidas em meio HS e sisal apresentaram boas propriedades a partir das condições de síntese adotadas: 3% de inóculo bacteriano, temperatura de incubação de 30°C e período de incubação de sete dias. No entanto, a película de caju apresentou-se muito frágil e, por vezes, pouco resistente ao manuseio, de modo que, para suprir este problema, o período de incubação para o caju foi estendido para dez dias. Este período adicional de incubação não levou a um acréscimo diferenciado em termos de tamanho ou espessura do material, mas proporcionou um pequeno ganho de estabilidade do hidrogel formado, permitindo assim seu adequado manuseio.

### 5.3. Obtenção dos Compósitos CB-HA

A técnica *in situ* não permitiu obter uniformidade na deposição da hidroxiapatita. Independentemente das formulações testadas com hidroxiapatita e carboximetilcelulose, observou-se um baixo grau de deposição da hidroxiapatita sobre a celulose formada. É possível que, mesmo com a adição de CMC, boa parte da HA tenha sedimentado e apenas uma pequena parcela tenha permanecido em suspensão. A preparação dos compósitos via adaptação de Hutchens (2006) apresentou resultados mais satisfatórios. Após

o final dos seis ciclos de HA, obteve-se um compósito mais denso e esbranquiçado com revestimento uniforme de hidroxiapatita (FIGURA 10).

Figura 10 - Película de celulose bacteriana e compósito celulose bacteriana-hidroxiapatita



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em função destes resultados, da facilidade da técnica e do método simular bem o efeito biomimético que ocorre naturalmente no meio fisiológico, optou-se por trabalhar apenas com esta técnica.

Como já observado, a película de caju se mostrou muito frágil e, de algum modo, essa fragilidade se refletiu no processo adotado para a preparação dos compósitos. Prolongou-se o período de formação das películas de caju para dez dias, visando sempre à obtenção de uma película mais rígida e resistente ao manuseio, ainda úmida. Na etapa de purificação com NaOH, procurou-se evitar tratamento muito agressivo que pudesse fragilizar ainda mais o material. Por fim, para se conseguir uma reproduzibilidade similar aos compósitos HS-HA e Sisal-HA, o número de ciclos de imersão para o caju precisou ser duplicado, ou mesmo triplicado, até se conseguir um grau de deposição próximo ao dos demais resíduos utilizados. Só então o material seguiu para caracterização.

#### **5.4. Caracterização dos Materiais Obtidos (CB e CB-HA)**

##### **5.4.1. Determinação da Espessura**

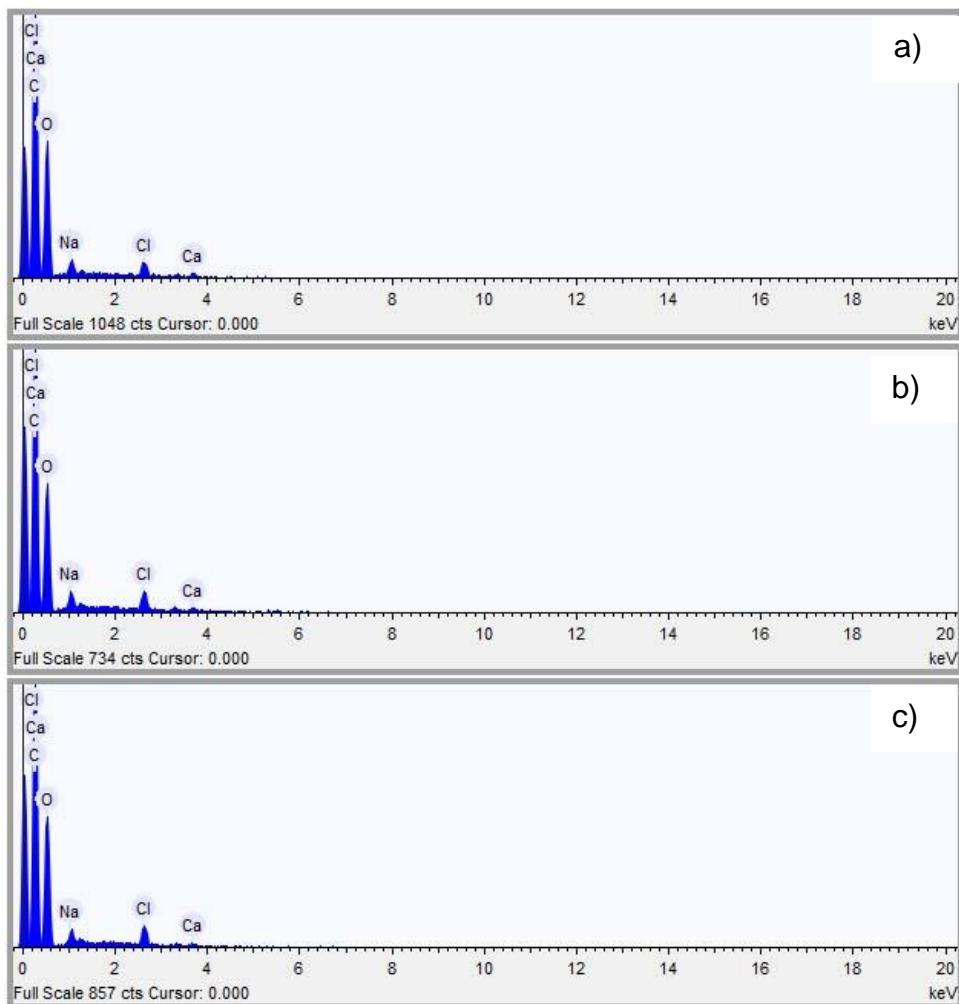
As amostras de celulose bacteriana apresentaram pequenas variações nas espessuras, sendo que a adição de apatita para formação do

compósito contribuiu para o aumento dos valores medidos. Os valores médios de espessura foram de  $15 \pm 3 \mu\text{m}$  para as películas puras e  $88 \pm 6 \mu\text{m}$  para os compósitos com deposição média de 43,3% de apatita.

#### 5.4.2. Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A composição elementar das celuloses produzidas foi determinada por meio de EDS, confirmando a presença majoritária de carbono e oxigênio (FIGURA 11).

Figura 11 - EDS de celulose bacteriana obtida a partir de a) meio HS; b) suco de caju; c) resíduo líquido de sisal



Fonte: Elaborado pelo autor

Em todas as películas analisadas, o teor de carbono encontrado foi de aproximadamente 53,17% do peso da amostra, sendo o restante

predominantemente constituído por oxigênio e concentrações insignificantes de outros elementos como traços de contaminantes. Comparativamente, em seu trabalho, e partindo também de diferentes fontes de carboidratos, Demello (2012) obteve o valor de 55% para o teor de carbono.

Com base na fórmula molecular da celulose ( $C_6H_{10}O_5$ ) $n$  é possível estimar sua razão C/O – levando-se em consideração sua relação estequiométrica de seis átomos de carbono para cada cinco átomos de oxigênio – como sendo igual a 1,2. Valores de razão C/O próximos são úteis para se identificar um paralelo na composição química das diferentes amostras. Pequenas discrepâncias podem ser atribuídas à contaminação de carbono na câmara de EDS. Para as amostras de celulose obtidas a partir de meio HS, suco de caju e resíduo líquido de sisal, a relação atômica de carbono para oxigênio foi determinada através dos dados da TABELA 3 como sendo de 1,20; 1,22 e 1,21, respectivamente, o que sugere sua proximidade em termos de estequiometria, composição química e pureza.

Tabela 3 - Análise química por EDS da celulose bacteriana obtida a partir de meio HS, suco de caju e resíduo líquido de sisal

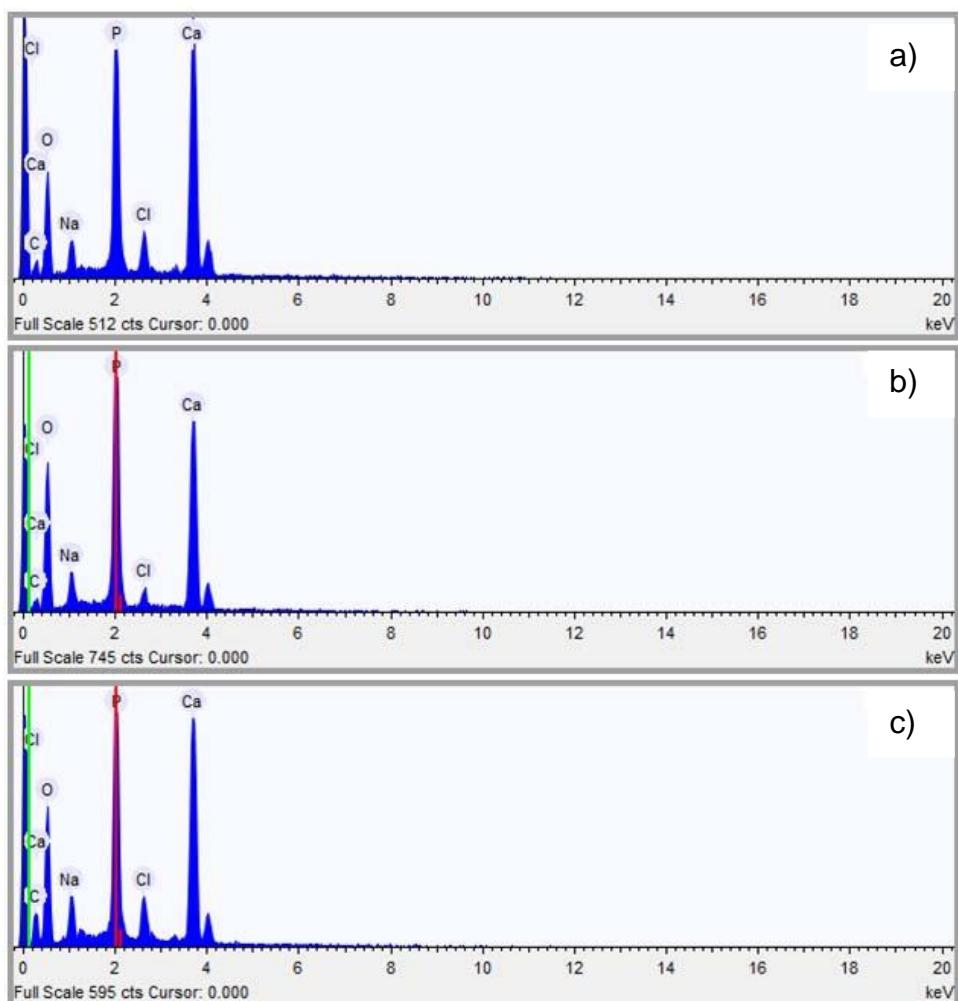
Elemento	HS massa %	Caju massa %	Sisal massa %
Carbono	53,02 ± 0,16	53,25 ± 0,00	53,24 ± 0,16
Oxigênio	44,21 ± 0,39	43,67 ± 0,17	43,91 ± 0,21
Sódio	1,14 ± 0,15	1,35 ± 0,08	1,23 ± 0,06
Cloro	1,15 ± 0,15	1,37 ± 0,01	1,38 ± 0,16
Cálcio	0,47 ± 0,07	0,38 ± 0,10	0,24 ± 0,17

Fonte: Elaborada pelo autor

A razão Ca/P, por sua vez, é uma das formas utilizadas para caracterizar a composição dos fosfatos de cálcio, sendo que as apatitas podem apresentar diferentes composições (ARAÚJO, 2006). A fórmula da hidroxiapatita estequiométrica é  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , com razão Ca/P igual a 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos. No entanto, a técnica de Hutchens (2006) envolve a obtenção de apatita não estequiométrica

(Ca/P < 1,67). Para corroborar esta ideia procedeu-se a análise de EDS dos nanocompósitos CB-HA. Os espectros são apresentados na FIGURA 12.

Figura 12 - EDS dos compósitos CB-HA obtidos a partir de a) Meio HS; B) Suco de caju; c) Resíduo líquido de sisal



Fonte: Elaborada pelo autor

As razões Ca/P, calculadas com auxílio da TABELA 4, variaram entre 1,53-1,58 demonstrando que a hidroxiapatita é, realmente, deficiente em cálcio. Traços de cloro, sódio e carbono também apareceram nos espectros. Os reagentes  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , utilizados durante a mineralização, podem ter deixado algum resíduo de cloro e sódio, respectivamente, enquanto que o carbono presente é atribuído à celulose (HUTCHENS, 2007).

Tabela 4 - Análise química por EDS dos compósitos obtidos a partir de meio HS, suco de caju e resíduo líquido de sisal

<b>Elemento</b>	<b>HS-HA</b>	<b>Caju-HA</b>	<b>Sisal-HA</b>
	<b>massa %</b>	<b>massa %</b>	<b>massa %</b>
Carbono	10,79 ± 0,71	9,36 ± 0,14	12,23 ± 0,72
Oxigênio	41,55 ± 0,58	53,29 ± 0,37	45,92 ± 0,22
Sódio	1,35 ± 0,98	3,31 ± 0,11	3,53 ± 0,11
Fósforo	17,69 ± 0,26	12,56 ± 0,60	13,76 ± 0,20
Cloro	1,20 ± 0,52	2,24 ± 0,32	2,87 ± 0,84
Cálcio	27,43 ± 0,41	19,24 ± 012	21,70 ± 0,29

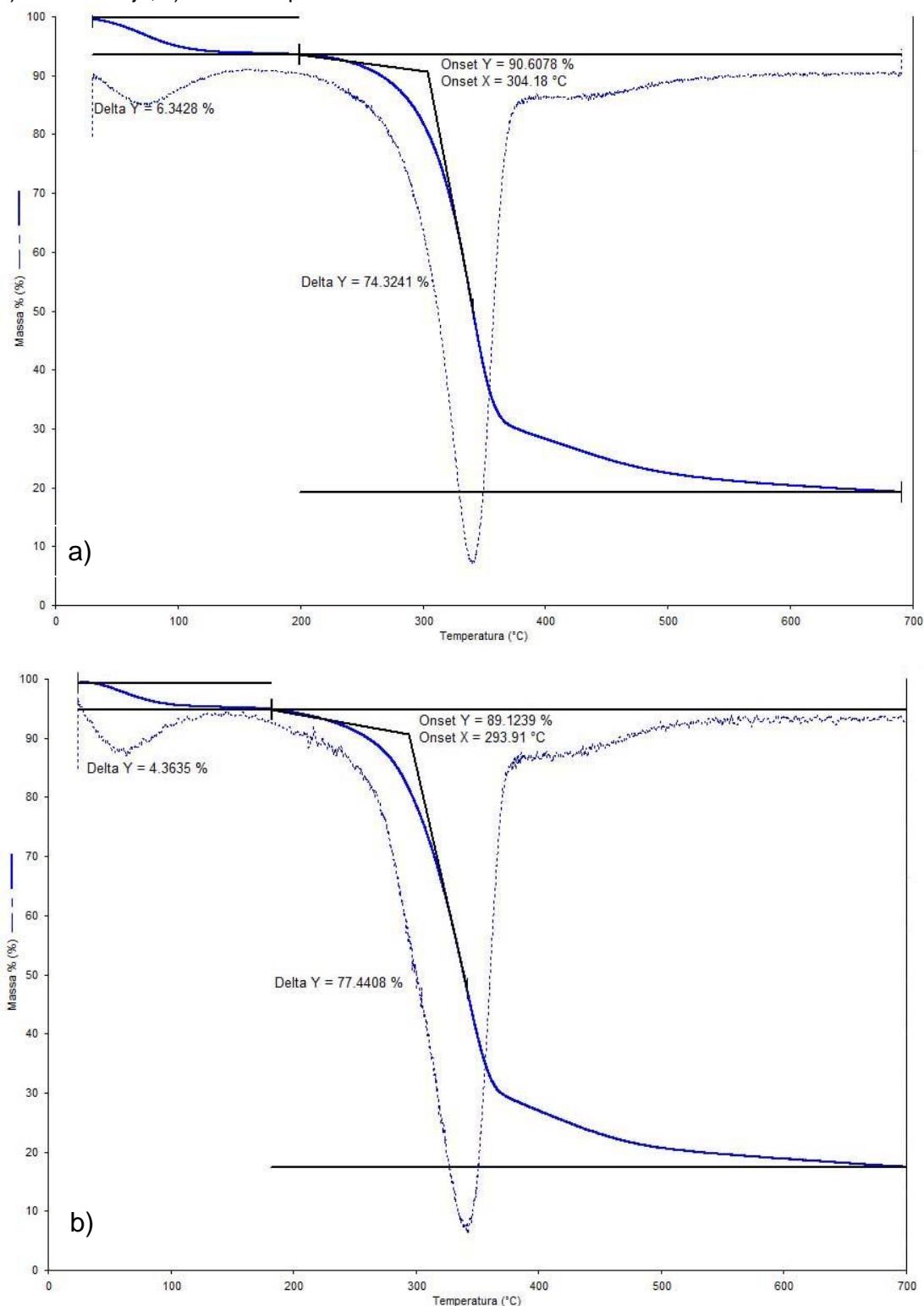
Fonte: Elaborada pelo autor

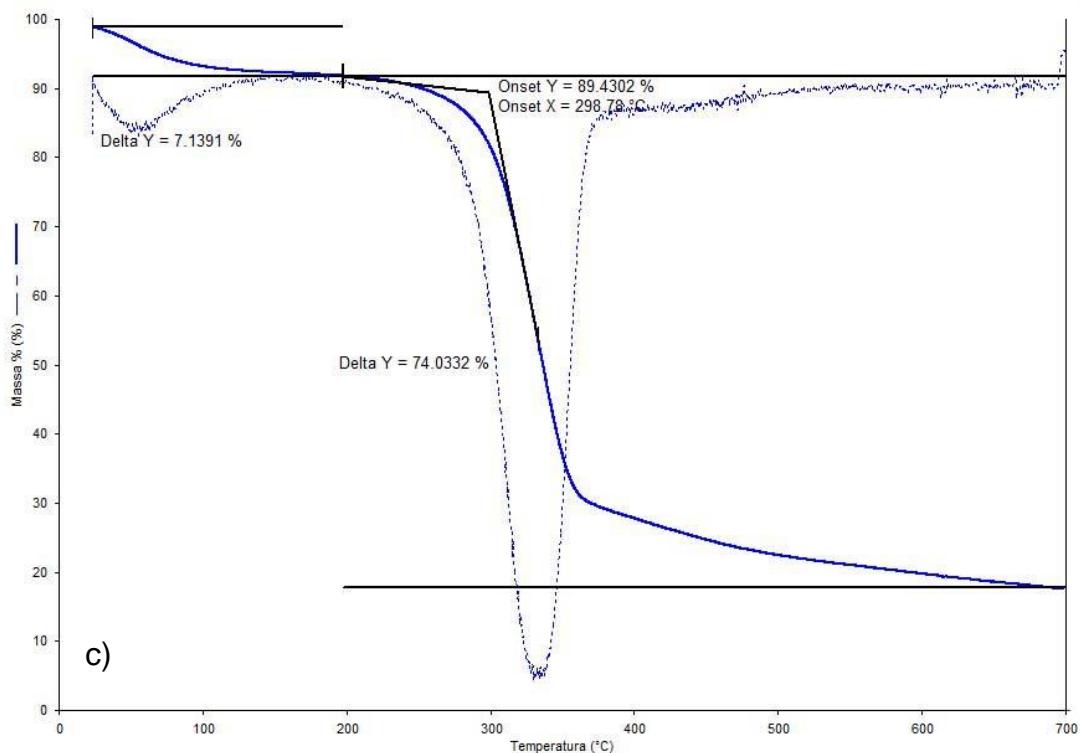
#### **5.4.3. Análise Termogravimétrica (ATG)**

A análise termogravimétrica é usada para determinar mudanças de massa da amostra, a fim de se estabelecer a faixa de temperatura na qual o material adquire composição química definida ou a temperatura em que se inicia o processo de decomposição (ARAÚJO, 2006). Ao se lançar mão desta técnica, combinada com DSC, a CB pode ser caracterizada por meio da identificação das faixas de temperatura em que ocorrem, respectivamente, perda de umidade e degradação de suas cadeias poliméricas. Desta maneira, os biopolímeros obtidos, a partir dos diferentes meios, podem ser comparados entre si e com dados da literatura.

As curvas de ATG e sua derivada (DTG), para as películas de celulose bacteriana, estão representadas na FIGURA 13.

Figura 13 - Análise termogravimétrica da película de celulose bacteriana obtida em a) meio HS; b) suco de caju; c) resíduo líquido de sisal





Fonte: Elaborada pelo autor

As três películas apresentaram perfis de degradação semelhantes. Analisando-se as curvas, observa-se uma primeira perda de massa (4-8%), aproximadamente a 100°C devido à evaporação de pequena quantidade de água absorvida. Em temperaturas mais elevadas, ocorre outra perda de massa devido aos processos de degradação da celulose, tais como: despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas, seguida pela formação de resíduos de carbono (BARUD *et al.*, 2007; BARUD *et al.*, 2008; SASKA *et al.*, 2011; WAN *et al.*, 2007). Este é o principal evento característico da celulose podendo assumir valores entre 220 e 400°C (NUNES, 2012; ROMAN; WINTER, 2004; SASKA *et al.*, 2011; WONG; KASAPIS; TAN, 2009). Há ainda outra fase, mais discreta, que se estende da região de 400 até 500°C, correspondente à degradação termo-oxidativa do material. Todo esse comportamento térmico observado está bem de acordo com os resultados relatados na literatura (BARUD *et al.*, 2007; GEA *et al.*, 2011; GEORGE *et al.*, 2005; JEON *et al.*, 2010; SANZ; RUBIO; LAGARON, 2011; STUMPF *et al.*, 2013; SURMA-ŚLUSARSKA; PRESLER; DANIELEWICZ, 2008). Adicionalmente, verifica-se que o início da segunda fase de perda de massa apresenta diferenças sutis para os três materiais. A temperatura *onset* ( $T_{\text{onset}}$ ),

observada nas curvas, não indicou diferença significativa de estabilidade térmica entre as películas de celulose pura. No entanto, pode-se considerar, para efeito de comparação, a película de HS ( $T_{onset} = 304^{\circ}\text{C}$ ) como a mais estável termicamente, seguida pelas de sisal ( $T_{onset} = 299^{\circ}\text{C}$ ) e caju ( $T_{onset} = 294^{\circ}\text{C}$ ). Por outro lado, ao se analisar as curvas de DTG, pode-se constatar que a máxima degradação térmica ocorreu ao redor de  $340^{\circ}\text{C}$ . Este valor está em concordância com os obtidos por Pértille (2007), Wong *et al.* (2009) e Gea *et al.* (2011), que observaram a máxima degradação térmica (DTG) da CB no intervalo de 300 a  $350^{\circ}\text{C}$ . Tal resultado também é uma evidência de que o processo de purificação aplicado às películas foi adequado. Gea *et al.* (2011) testaram dois métodos de purificação comparando as películas purificadas com as não purificadas. Para estas, constataram a ocorrência de picos de DTG entre 150 e  $250^{\circ}\text{C}$ , atribuídos à presença de estruturas proteicas remanescentes do processo de obtenção. Essas mesmas películas, quando submetidas aos métodos de purificação, apresentaram picos de DTG ao redor de  $320^{\circ}\text{C}$ .

A TABELA 5 apresenta os dados de perda de massa percentual para cada meio de cultivo com suas respectivas temperaturas, tomadas a partir das curvas DTG. Como os valores encontrados não são fixos e dependem da fonte de celulose (UESU; PINEDA; HECHENLEITNER, 2000), é comum observar pequenas variações entre os valores de perda de massa e temperatura dependendo da fonte de nutrientes empregada. Vale salientar que as perdas de massa podem apresentar variações mesmo para amostras obtidas a partir do mesmo meio de fermentação. No presente estudo, desconsiderando-se as perdas associadas à desidratação, observa-se perda de massa máxima da ordem de 77,4% na temperatura de  $341^{\circ}\text{C}$  para a película de caju. Ao final da análise, um resíduo carbonáceo, calculado a partir das diferenças de massa final e inicial, foi observado para todas as membranas de celulose pura de cerca de 24,8% (valor médio).

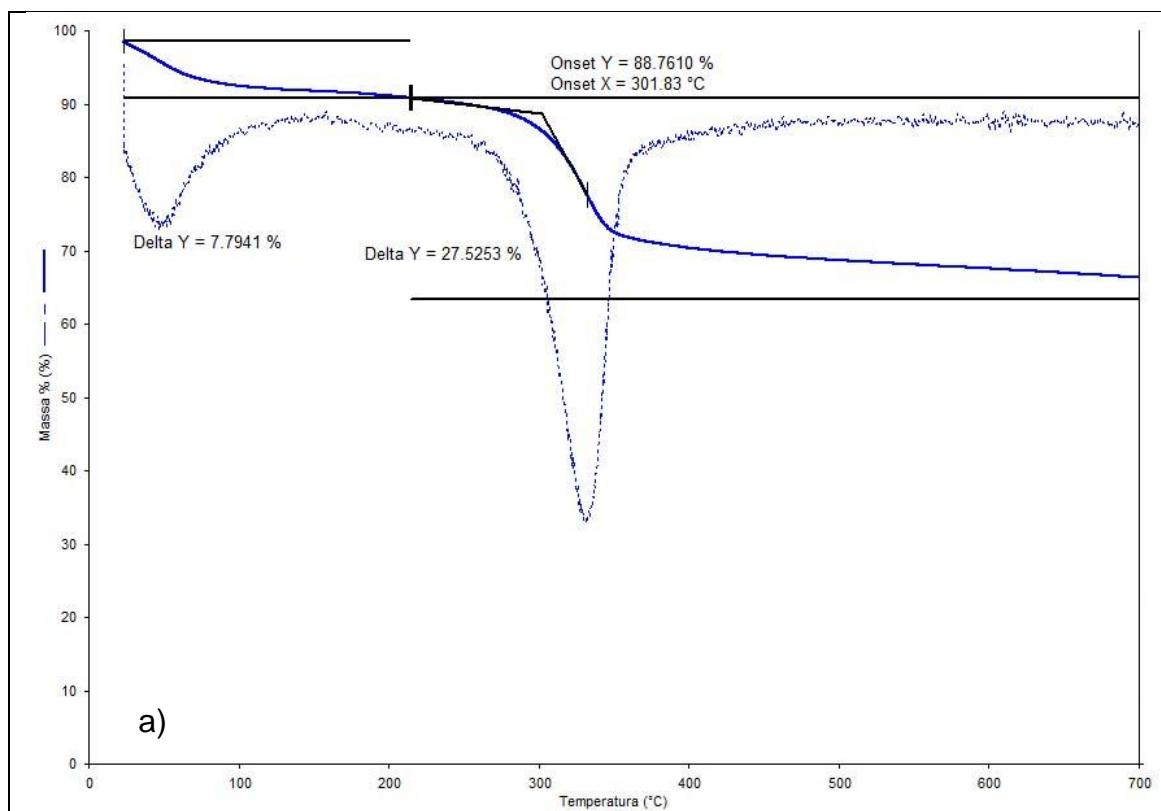
Tabela 5 - Perda de massa percentual das amostras

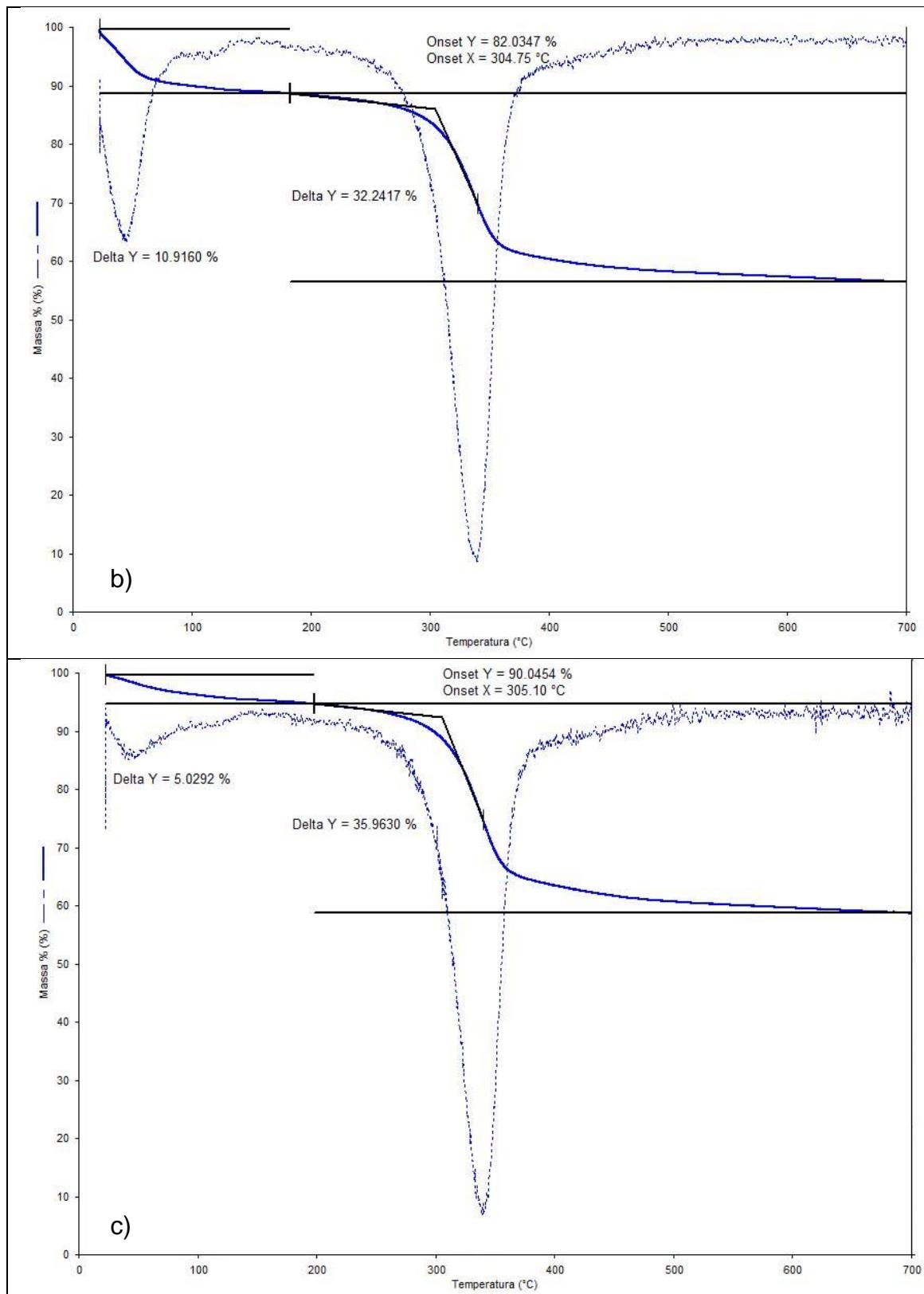
<b>Meio</b>	<b>Evento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Perda de Massa Percentual</b>
HS	2ª perda de massa	340°C	74,3%
Caju	2ª perda de massa	341°C	77,4%
Sisal	2ª perda de massa	332°C	74,0%

Fonte: Elaborada pelo autor

A FIGURA 14 mostra os resultados de ATG para os compósitos CB-HA. A análise termogravimétrica foi realizada para estimar a estabilidade térmica e os perfis de degradação desses materiais. As amostras apresentaram uma pequena perda de massa inicial (5-11%) devido à eliminação de água.

Figura 14 - ATG do compósito CB-HA obtido a partir de a) meio HS; b) suco de caju; c) resíduo líquido de sisal





Fonte: Elaborada pelo autor

Por volta de 340°C (DTG), a decomposição das amostras levou a uma perda importante de massa. Mais uma vez, este evento pode ser

associado ao processo de degradação da celulose, seguido pela formação de um resíduo carbonizado (BARUD *et al.*, 2007; BARUD *et al.*, 2008; SASKA *et al.*, 2011; WAN *et al.*, 2007). Os compósitos CB-HA apresentaram um resíduo de 68,1%, (valor médio) superior ao observado para a membrana de celulose pura, de 24,8%. A quantidade maior de resíduo para os compósitos foi atribuída à presença de hidroxiapatita. Como, em geral, ela apresenta estabilidade térmica na faixa de temperatura considerada, a diferença entre esses valores permitiu estimar a quantidade de HA depositada. O valor obtido foi de aproximadamente 43,3%. Saska *et al.* (2011), também trabalharam com compósitos CB-HA obtidos via Hutchens e, através de ATG, estimaram a quantidade de HA depositada como sendo de 50%. No entanto, o máximo valor de temperatura a que as amostras foram submetidas foi de 600°C.

A temperatura *onset* ( $T_{\text{onset}}$ ) observada nas curvas não indicou diferença expressiva de estabilidade térmica entre a celulose pura e os compósitos. A ( $T_{\text{onset}}$ ) da CB ficou em aproximadamente 299°C (valor médio), ao passo que a ( $T_{\text{onset}}$ ) para os compósitos CB-HA ficou em  $\cong 304^{\circ}\text{C}$ .

Os valores de temperatura, tomados pelos picos das curvas DTG, e as perdas de massa associadas, podem ser consultados na TABELA 6.

Tabela 6 - Perda de massa percentual das amostras

<b>Meio</b>	<b>Evento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Perda de Massa Percentual</b>
HS	2ª perda de massa	331°C	27,5%
Caju	2ª perda de massa	339°C	32,2%
Sisal	2ª perda de massa	340°C	34,0%

Fonte: Elaborada pelo autor

#### **5.4.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

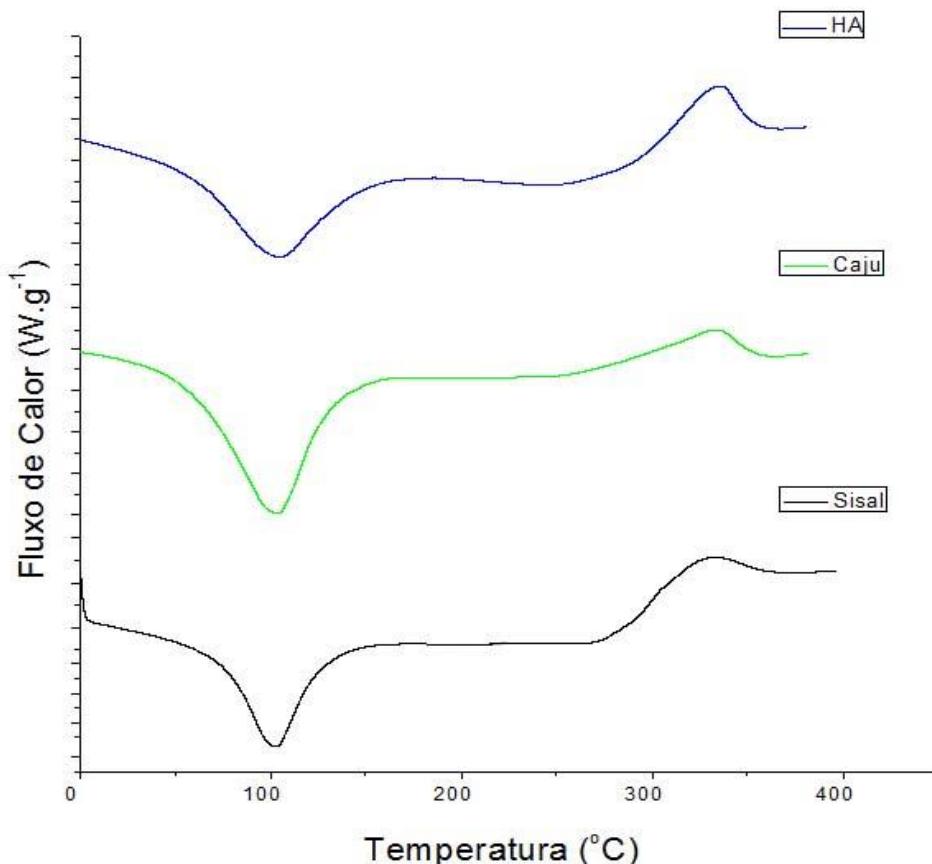
As FIGURAS 15 e 16 exibem as curvas DSC das membranas obtidas a partir de HS, suco de caju e resíduo líquido de sisal e seus materiais compósitos, respectivamente. Como se pode observar, todas as curvas são praticamente idênticas entre si.

Normalmente, um pico endotérmico a cerca de 100°C é observado, devido à perda de água, porém, em temperaturas superiores a 100°C um

evento amplo endotérmico também é característico de desidratação (FIGURA 15). A literatura destaca que em temperaturas elevadas ( $>270^{\circ}\text{C}$ ), a curva de DSC apresenta um aumento de fluxo de calor (fenômeno exotérmico), que é atribuído ao estágio inicial de degradação da celulose, sendo que em torno de  $350^{\circ}\text{C}$ , ocorre efetivamente a degradação das cadeias celulósicas. Quanto mais largo for este pico, que também corresponde ao início da fase de oxidação do material, maior a estabilidade térmica da amostra (NUNES, 2012).

Neste trabalho, os dois eventos característicos da celulose foram evidenciados para todas as películas obtidas. O evento principal, de degradação térmica, apresentou caráter exotérmico, tal qual alguns trabalhos encontrados na literatura (BARUD *et al.*, 2007; SURMA-ŚLUSARSKA; PRESLER; DANIELEWICZ, 2008).

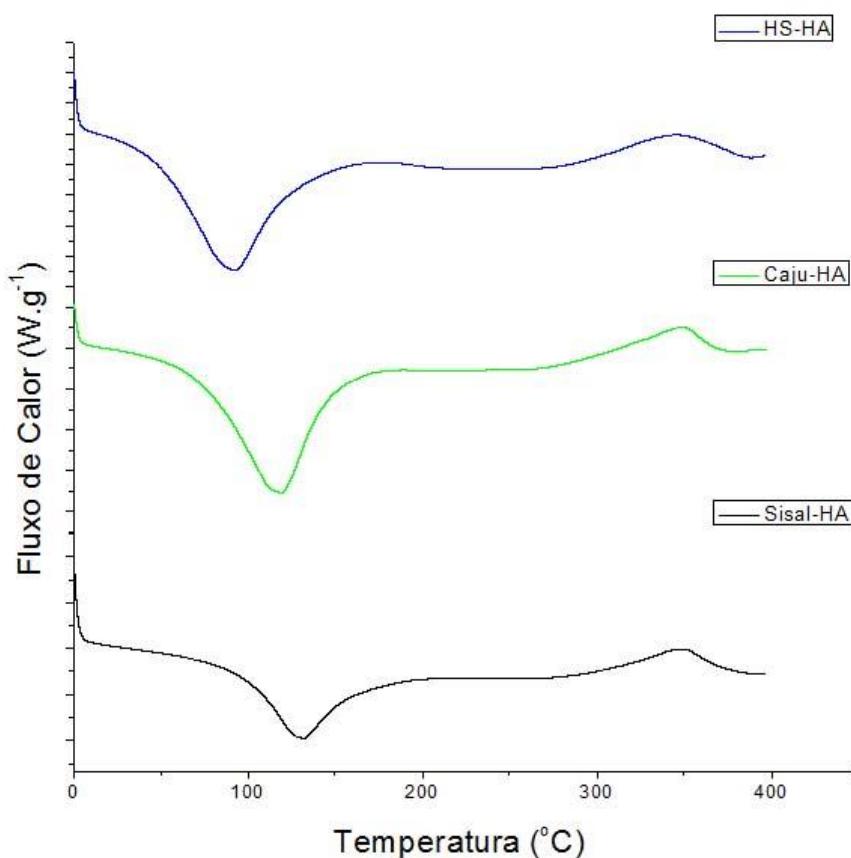
Figura 15 - Calorimetria exploratória diferencial da película de celulose bacteriana obtida em meio HS, suco de caju e resíduo líquido de sisal



Fonte: Elaborada pelo autor

Em relação aos materiais compósitos, as curvas mantiveram o comportamento típico de CB, mesmo na presença de hidroxiapatita, indicando a estabilidade térmica deste material no intervalo de temperatura estudado. Este resultado está de acordo com Araújo (2006), segundo o qual a decomposição de HA ocorre apenas em temperaturas acima de 700°, sendo frequentemente observada durante a fabricação de HA cerâmica. Portanto, comparando-se os perfis das curvas, pode-se concluir que as modificações introduzidas na CB não alteraram sua estabilidade térmica.

Figura 16 - Calorimetria exploratória diferencial dos compósitos HS-HA, Caju-HA e Sisal-HA

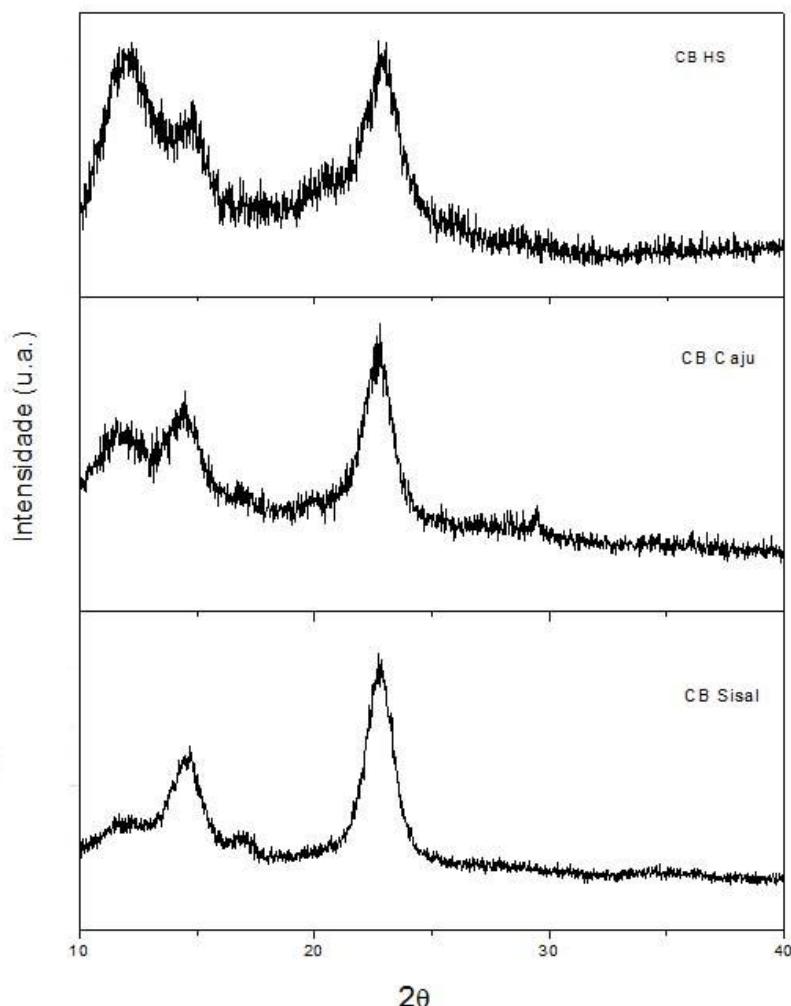


Fonte: Elaborada pelo autor

#### 5.4.5. Difração de Raios X (DRX)

A FIGURA 17 mostra os difratogramas de Raios X das películas de CB.

Figura 17 - Difratograma da celulose bacteriana obtida a partir de meio HS, suco de caju e resíduo líquido de sisal



Fonte: Elaborada pelo autor

Analizando-se os resultados obtidos no DRX, observa-se que a celulose apresenta três picos de difração em  $2\theta = 15^\circ$ ,  $17^\circ$  e  $22,5^\circ$  que são normalmente atribuídos à distância interplanar característica das fases I<sub>α</sub> e I<sub>β</sub> da estrutura cristalina elementar da celulose ( $100_{I\alpha}$ ,  $110_{I\beta}$  e  $010_{I\beta}$  são referentes ao ângulo de  $15^\circ$  e  $110_{I\alpha}$  e  $200_{I\beta}$  ao de  $22,5^\circ$ ) (BARUD *et al.*, 2008; COSTA; ROGERO; LUGÃO, 2007; SASKA *et al.*, 2011). A estrutura I<sub>β</sub>, monoclinica, é dominante na celulose de origem vegetal, enquanto que I<sub>α</sub>, triclinica, é prevalente na celulose produzida por algas e bactérias (COSTA; ROGERO; LUGÃO, 2007; HUANG *et al.*, 2014). A ausência de picos adicionais nos difratogramas elimina a presença de precursores ou de outras impurezas (UI-ISLAM, 2014).

O comportamento físico-químico de um polímero é fortemente influenciado pelo grau de cristalinidade da sua estrutura. Por exemplo, a cristalinidade da celulose influencia diretamente as propriedades de degradação, absorção e retenção de água (SCHENZEL *et al.*, 2005; PÉRTILE, 2007). Os estudos de difração de Raios X permitiram avaliar a cristalinidade dos substratos celulósicos. As intensidades dos picos foram obtidas através dos gráficos da FIGURA 17, característicos de celulose tipo Ia, onde o halo amorfó e o pico cristalino ficaram situados entre os ângulos de  $17 \leq 2\theta \leq 19^\circ$  e  $22 \leq 2\theta \leq 23^\circ$ .

A TABELA 7 apresenta os índices calculados a partir da Equação (5).

Tabela 7 - Índices de cristalinidade (IC) para CB obtida em meio HS, suco de caju e resíduo líquido de sisal

Meio	IC (%)
HS	70,1
Caju	66,7
Sisal	79,0

Fonte: Elaborada pelo autor

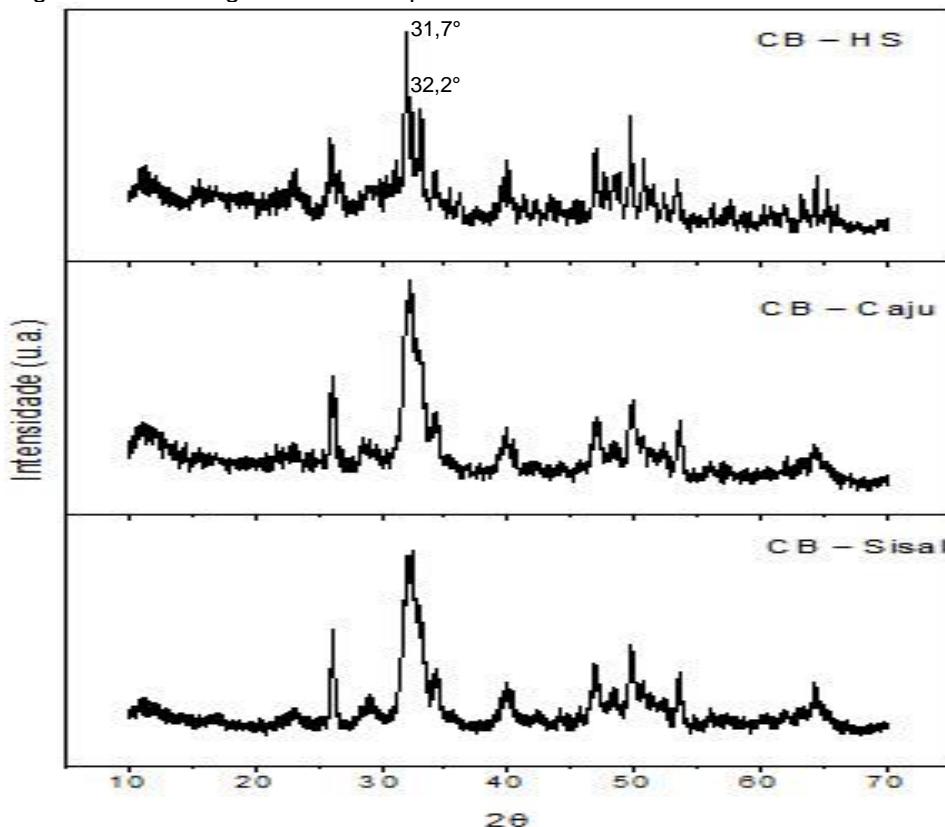
Para as amostras em estudo, a cristalinidade ficou entre 66,7 e 79,0%, sendo a menor obtida para a celulose de caju e a maior obtida para a celulose de sisal, a qual superou até mesmo o valor de IC para o meio padrão. Essa pequena diferença ocorre pelo fato do grau de cristalinidade da celulose, definido como a proporção relativa de polímero com zonas altamente ordenadas, variar consoante a sua origem e o seu pré-tratamento. Vale salientar que esses resultados estão dentro de valores esperados, uma vez que a celulose bacteriana possui um grau de cristalinidade entre 60 e 90%, que é relativamente superior ao dos filmes de celulose regenerada, que se encontra entre 40 a 45% (UI-ISLAM, 2014; KLEMM, 1998). Pértle (2007) trabalhando com membranas de CB sintetizadas pela bactéria *G. Hansenii*, cultivadas em meio HS a 30°C por sete dias, obteve um grau de cristalinidade estimado em  $56 \pm 5\%$ .

A cristalinidade da HA pode ser avaliada qualitativamente pelos picos de difração de Raios X, pois amostras contendo picos acentuados e

agudos tem maior cristalinidade do que amostras que apresentem picos de difração largos e de baixa intensidade (ARAÚJO, 2006). Para todos os compósitos obtidos, a mais alta cristalinidade da hidroxiapatita promove redução da intensidade das reflexões dos picos da celulose, embora esta fase também apresente comportamento cristalino. De acordo com Hutchens *et al.* (2006), a diminuição da intensidade dos picos de celulose, em comparação com o padrão obtido a partir de membrana de celulose pura, ocorre em função da deposição de HA sobre as nanofibrilas de CB.

Foram identificados picos característicos de cristais CB-HA (FIGURA 18). Picos de difração (PDF#03-0289) em  $2\theta = 15^\circ$  e  $22,5^\circ$  foram atribuídos às fases I $\alpha$  e I $\beta$  da celulose (planos  $100_{1\alpha}$ ,  $110_{1\beta}$  e  $010_{1\beta}$  em  $15^\circ$  e  $110_{1\alpha}$  e  $200_{1\beta}$  em  $22,5^\circ$ ) (BARUD *et al.*, 2008). Os principais picos de difração característicos da HA foram observados em  $2\theta = 31,7^\circ$ ,  $32,2^\circ$ , relativos aos planos [211], [112] da rede cristalina (ARAÚJO, 2006). A identificação foi realizada de acordo com a ficha JCPDS 46-0905 para hidroxiapatita cálcio-deficiente.

Figura 18 - Difratograma dos compósitos CB-HA

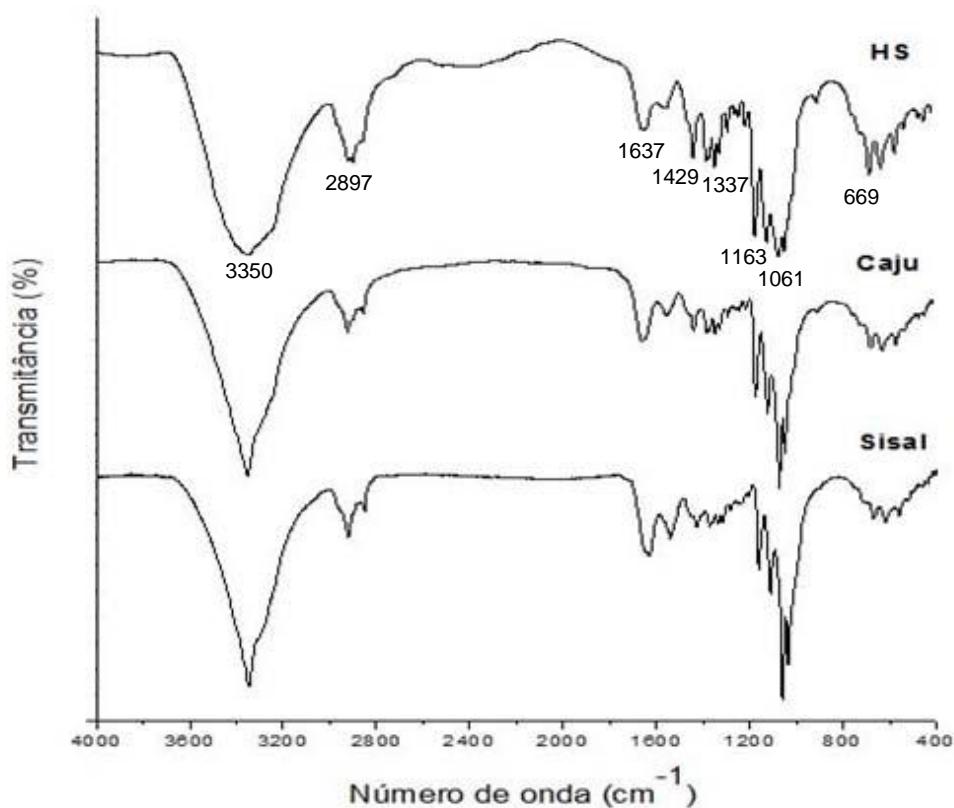


Fonte: Elaborada pelo autor

#### 5.4.6. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

Os principais grupos funcionais característicos da celulose bacteriana com suas principais bandas e respectivas atribuições, encontradas nos materiais estudados, são mostrados na TABELA 8. Os espectros de FTIR (FIGURA 19) das amostras analisadas seguem o perfil característico reportado na literatura (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008; OH *et al.*, 2005; SANZ; RUBIO; LAGARON, 2011; YAMAMOTO; HORII; HIRAI, 1996).

Figura 19 - Espectros de infravermelho das amostras celulose bacteriana de HS, suco de caju e resíduo líquido de sisal



Fonte: Elaborada pelo autor

A banda na região de  $3350\text{ cm}^{-1}$  é característica do estiramento dos grupos hidroxila presentes na celulose tipo I. Além desta, as principais atribuições que caracterizam o polímero de celulose são:  $2900\text{ cm}^{-1}$ : estiramento CH e estiramento assimétrico  $\text{CH}_2$ ;  $1637\text{ cm}^{-1}$ : deformação OH;  $1427\text{ cm}^{-1}$ : deformação  $\text{CH}_2$ ;  $1336\text{ cm}^{-1}$ : deformação OH. Outra banda

interessante, localizada ao redor de 400 a 700 cm<sup>-1</sup>, é característica de torção angular dos grupos OH.

Tabela 8 - Modos vibracionais na região do infravermelho para as películas de celulose puras

<b>Tipo de Ligação</b>	<b>Número de Onda (cm<sup>-1</sup>)</b>			<b>Referência</b>
	<b>HS</b>	<b>Caju</b>	<b>Sisal</b>	
$\nu(O-H)$ Celulose I	3350	3348	3346	(YAMAMOTO; HORII; HIRAI, 1996)
$\nu(CH)$ ; $\nu_a(CH_2)$ (O-H) de absorção de água	2897	2918	2920	(MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008)
$\delta(HCH,OCH)$ no plano CH, deformação angular	1637	1647	1628	(OH <i>et al.</i> , 2005)
$\delta(HCH,OCH)$ no plano CH, deformação angular	1429	1427	1425	(OH <i>et al.</i> , 2005)
$\delta(HCH,OCH)$ no plano CH, deformação angular	1371	1371	1371	(OH <i>et al.</i> , 2005)
C-O-H	1337	1337	1337	
$\nu(CH_2)$ no plano $\nu_a(C-O-C)$ , deformação CH	1317	1315	1315	(MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008)
$\nu(C-C)$ , polissacarídeos celulose	1163	1163	1161	(MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008)
$\delta(C-O)$ de C-O-H de carboidrato	1111	1111	1111	(MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008)
$\delta(C-O-H)$ , fora do plano	1061	1061	1059	(MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008)
$\delta(C-O-H)$ , fora do plano	669	665	669	(OH <i>et al.</i> , 2005)

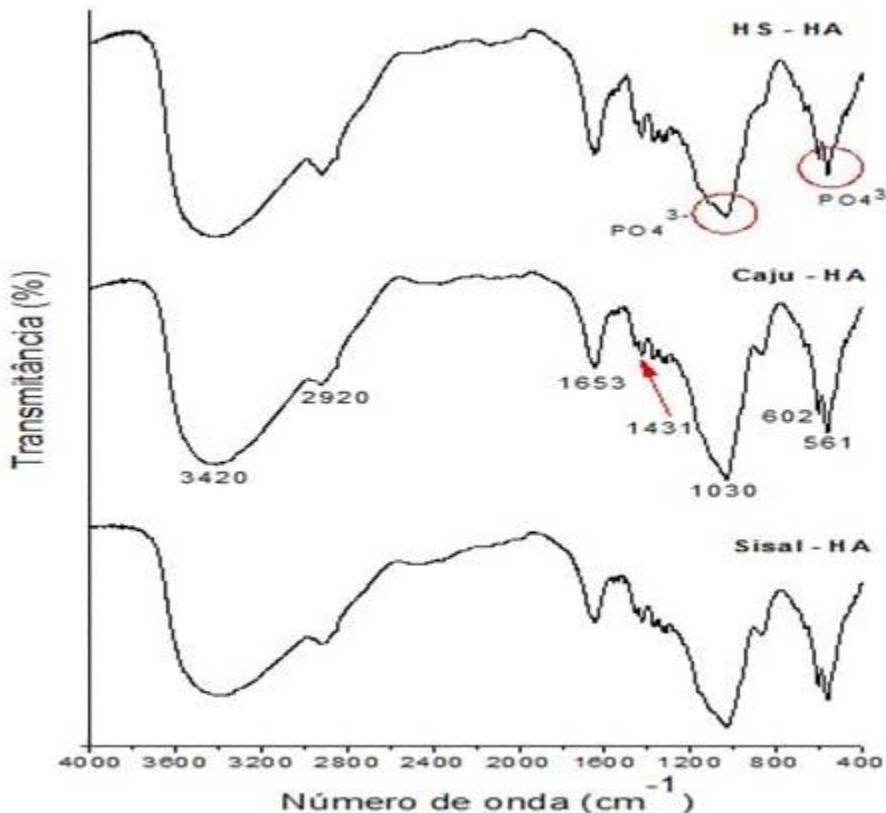
$\nu$  = estiramento;  $\nu_a$  = estiramento assimétrico;  $\delta$  = ligação

Fonte: Elaborada pelo autor

Várias bandas relevantes características da CB foram encontrados nas amostras analisadas, muitas delas relacionadas com ligações OH e CH. Esta técnica também permitiu confirmar que o processo de lavagem e purificação das películas foi bem sucedido uma vez que picos vibracionais adicionais referentes a nitrogênio (3150-3220, 3420), estruturas proteicas e lipídios (1730-1735) ou possíveis contaminantes não foram encontradas, sendo indicativos de pureza nas amostras de CB (GEA *et al.*, 2011).

Os espectros de infravermelho dos compósitos CB-HA são apresentados na FIGURA 20. Frequências de vibração características atribuídas à celulose foram observadas em 3500-3200 cm<sup>-1</sup> (grupos OH), 2910 cm<sup>-1</sup> (grupos CH, CH<sub>2</sub>), 1647 cm<sup>-1</sup> (ligação OH da água), 1427 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>), 1373 cm<sup>-1</sup> (CH) (BARUD *et al.*, 2008).

Figura 20 - Espectros de infravermelho dos compósitos CB-HA



Fonte: Elaborada pelo autor

A banda na região de 3500-3200 cm<sup>-1</sup>, atribuída aos grupos hidroxila, foi observada com intensidade relativa decrescente e alargamento da banda para o compósito, em comparação à membrana de CB pura. Este decréscimo de intensidade sugere que a presença dos cristais de HA afetou os grupos hidroxila da celulose (WAN *et al.*, 2006). Além disso, o desvio da banda atribuída à ligação de hidrogênio intramolecular ( $\cong 3.400\text{ cm}^{-1}$ ) confirma a forte interação entre o grupo OH e a apatita. Do ponto de vista biológico, essa interação química entre HA e CB estabiliza o composto de modo que possa manter a integridade mecânica necessária para a substituição óssea (SASKA *et al.*, 2011). As bandas de infravermelho em 1030 e 560-600 cm<sup>-1</sup> foram atribuídas aos modos vibracionais dos íons PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

A análise FTIR, além de confirmar a deposição de HA sobre as nanofibras de CB, também forneceu informações adicionais sobre como a hidroxiapatita foi formada sobre a matriz celulósica. Usualmente, a formação de HA a partir de soluções aquosas é precedida por uma fase precursora,

geralmente fosfato de cálcio amorfo (ACP),  $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_3$ , ou fosfato octacálcio (OCP),  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , que se hidroliza para formar uma fase mais estável de HA. A presença da banda dupla de  $\text{PO}_4^{3-}$  à  $602\text{cm}^{-1}$  e  $561\text{cm}^{-1}$ , sugere fortemente que esta fase precursora é o fosfato octacálcico (HUTCHENS, 2007; SASKA *et al.*, 2011). Antes da mineralização, o precursor conduz a uma complexação e organização dos cátions de cálcio, antes de se combinarem com o fosfato, o que garante o aparecimento de uma fase de hidroxiapatita mais cristalina e ordenada. O OCP, por possuir estrutura química próxima à hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , é considerado um precursor da hidroxiapatita biológica. Quando o precursor é ACP, observa-se uma única banda característica no lugar de duas (HUTCHENS, 2007).

#### **5.4.7. Ensaios Mecânicos**

Neste trabalho, as membranas de HS e resíduo líquido de sisal apresentaram resistência média à tração, respectivamente de 23,2 e 19,9 MPa (TABELA 9). Não foi possível realizar os testes com as películas de caju, pois elas romperam durante a manipulação, antes mesmo de ser iniciado o experimento.

Tabela 9 - Dados de ensaio de tração para as películas de HS e sisal

	Tensão				
Espessura ( $\mu\text{m}$ )	Máxima (MPa)	Tensão na Ruptura (MPa)	Deformação na Ruptura (%)	Módulo de Elasticidade (MPa)	
HS	$15,3 \pm 3,0$	$23,3 \pm 4,1$	$23,2 \pm 3,9$	$0,6 \pm 0,1$	$5339,3 \pm 1004,3$
Sisal	$14,9 \pm 3,0$	$20,2 \pm 3,7$	$19,9 \pm 3,6$	$0,8 \pm 0,3$	$3836,6 \pm 1742,0$

Fonte: Elaborada pelo autor

Os valores obtidos para tensão estão de acordo com dados da literatura. Segundo Pértille (2007), a resistência à tração das membranas de celulose bacteriana não tratadas apresenta valores geralmente maiores que 65 MPa. Porém, quando se realiza o tratamento ou purificação com NaOH, esta resistência diminui em função das propriedades de absorção do material. Durante o inchamento das fibras de celulose, as junções intramoleculares entre

as fibras se rompem, como resultado da tensão interna produzida pela absorção (MANTANIS; YOUNG; ROWELL, 1995; OLIVEIRA; PANDOLFELLI, 2011). Por conta disso, a ordenação entre as fibras é reduzida contribuindo para uma possível redução na resistência mecânica. Nos trabalhos realizados por Pértille (2007) e Recouvreux (2008), a resistência média obtida para as membranas de celulose secas, sintetizadas em meio HS, foi de 28 MPa. Em uma investigação prévia, George *et al.* (2005) obtiveram o valor de 43,68 MPa, mas o período de obtenção das películas foi de duas semanas.

No presente estudo, considerando-se que não houve qualquer suplementação auxiliar, que se empregou uma pequena quantidade de inóculo (3%) e que o período de cultivo foi de apenas sete dias, os resultados obtidos mostraram-se satisfatórios.

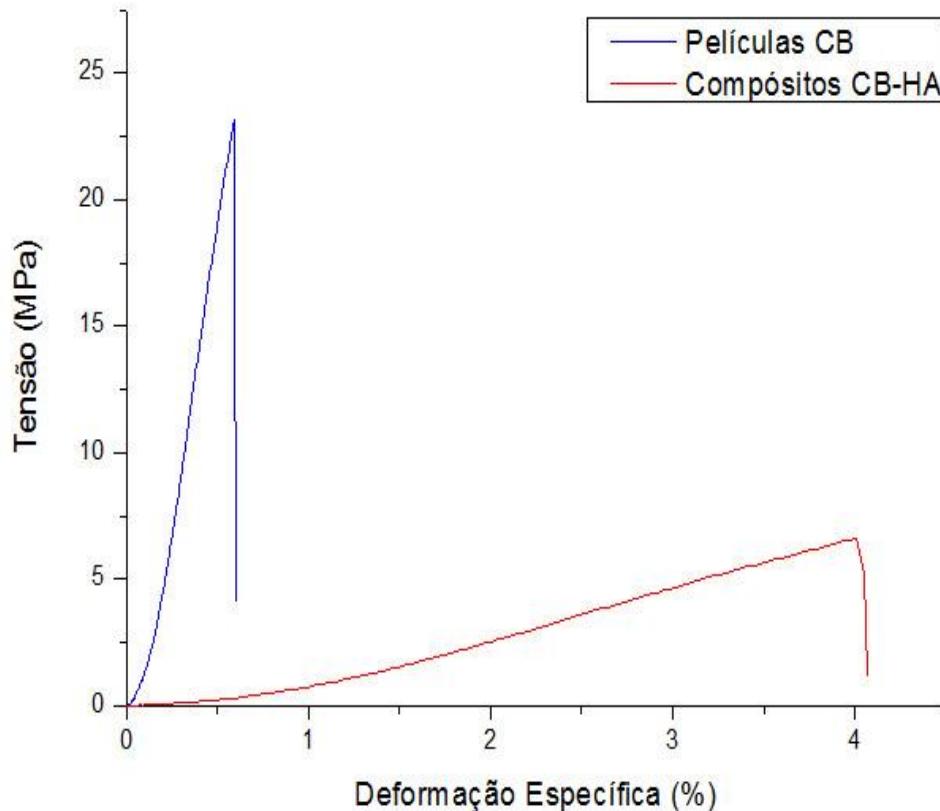
No que diz respeito aos compósitos, os parâmetros mecânicos, tensão na ruptura e deformação na ruptura mudaram em relação aos filmes de celulose bacteriana (TABELA 10). Observa-se que a adição da apatita mudou a estrutura polimérica do filme dando-lhe menor resistência, porém maior alongamento (FIGURA 21). Em outras palavras, houve redução da resistência à tração e do módulo de Young do compósito CB-HA em relação à CB pura. Como contrapartida, o compósito apresentou aumento na deformação na ruptura, demonstrando incremento na elasticidade do material (QUEIROZ, 2012).

Tabela 10 - Dados de ensaio de tração para os compósitos HS-HA e Sisal-HA

	Espessura (μm)	Tensão Máxima (MPa)	Tensão na Ruptura (MPa)	Deformação na Ruptura (%)	Módulo de Elasticidade (MPa)
HS-HA	81,7 ± 0,0	6,7 ± 1,0	6,6 ± 0,8	4,0 ± 0,6	352,5 ± 3,2
Sisal-HA	82,1 ± 0,0	4,0 ± 0,7	4,0 ± 0,7	3,1 ± 1,4	415,4 ± 3,1

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 21 - Curvas de tensão - deformação para películas e compósitos



Fonte: Elaborada pelo autor

A diminuição da resistência à tração pode ser explicada em função da quantidade de hidroxiapatita depositada e da formação de aglomerados de partículas que favorecem o aparecimento de falhas e defeitos internos como poros, vazios e microtrincas, os quais atuam como concentradores de tensão, reduzindo a resistência mecânica do material.

É evidente que materiais cerâmicos, como as apatitas, e poliméricos, como a celulose, tendem a apresentar comportamento mecânico diferenciado, tal qual evidenciado pelos resultados apresentados. Contudo, a combinação de suas propriedades se mostra relevante dentro do escopo da área biomédica.

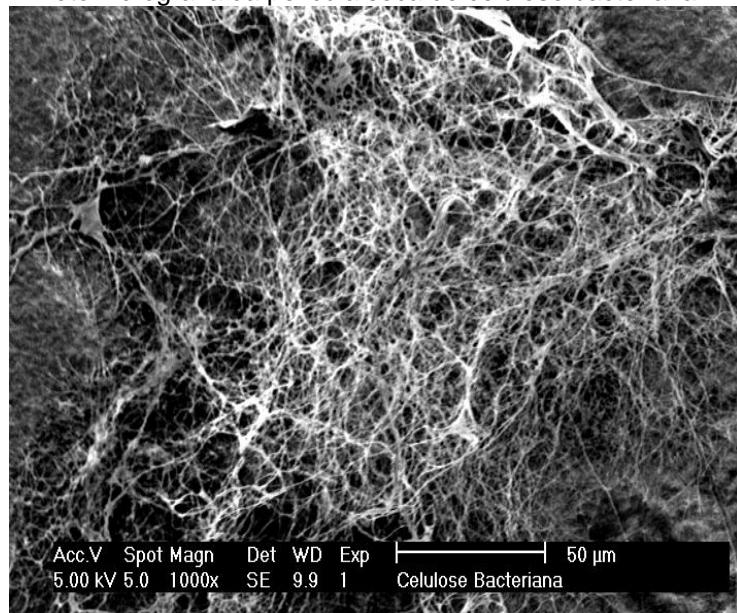
Biocerâmicas apresentam alto grau de bioatividade. Por outro lado, apresentam propriedades mecânicas, em geral, não adequadas à necessidade de produção de implantes para fins estruturais (JUNIOR; ORÉFICE, 2001). Os materiais cerâmicos apresentam baixa tenacidade à fratura, o que os torna frágeis e pouco indicados para o uso em regiões submetidas a tensões elevadas, e não têm boa capacidade de se deformar sob ação de uma força, o que, por sua vez, limita o uso de implantes cerâmicos quando o objetivo é

restauração de forma e contorno. Para contornar este tipo de problema e buscar materiais mais resistentes e com maior tenacidade, um dos principais recursos utilizados é o desenvolvimento de compósitos em matriz polimérica (TURRER; FERREIRA, 2008). A combinação com polímeros confere maior ductilidade, ou seja, capacidade de sofrer deformação plástica para absorver a energia de um impacto antes de ocorrer a fratura do material. Além disso, suas propriedades mecânicas permitem a sua utilização para substituição de tecidos moles ou rígidos como osso, observadas as questões relacionadas a tensões no sítio receptor. Deste modo, quando utilizado um compósito de hidroxiapatita com celulose, a matriz fibrosa passa a responder pela resistência mecânica e a apatita pelas propriedades de osteocondutividade e habilidade de ligação com o osso (TURRER; FERREIRA, 2008).

#### **5.4.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A FIGURA 22 mostra uma imagem típica da membrana de CB seca obtida para o meio de composição definida. Uma estrutura de rede ultrafina formada por nanofibras contínuas pode ser observada.

Figura 22 - Fotomicrografia da película seca de celulose bacteriana



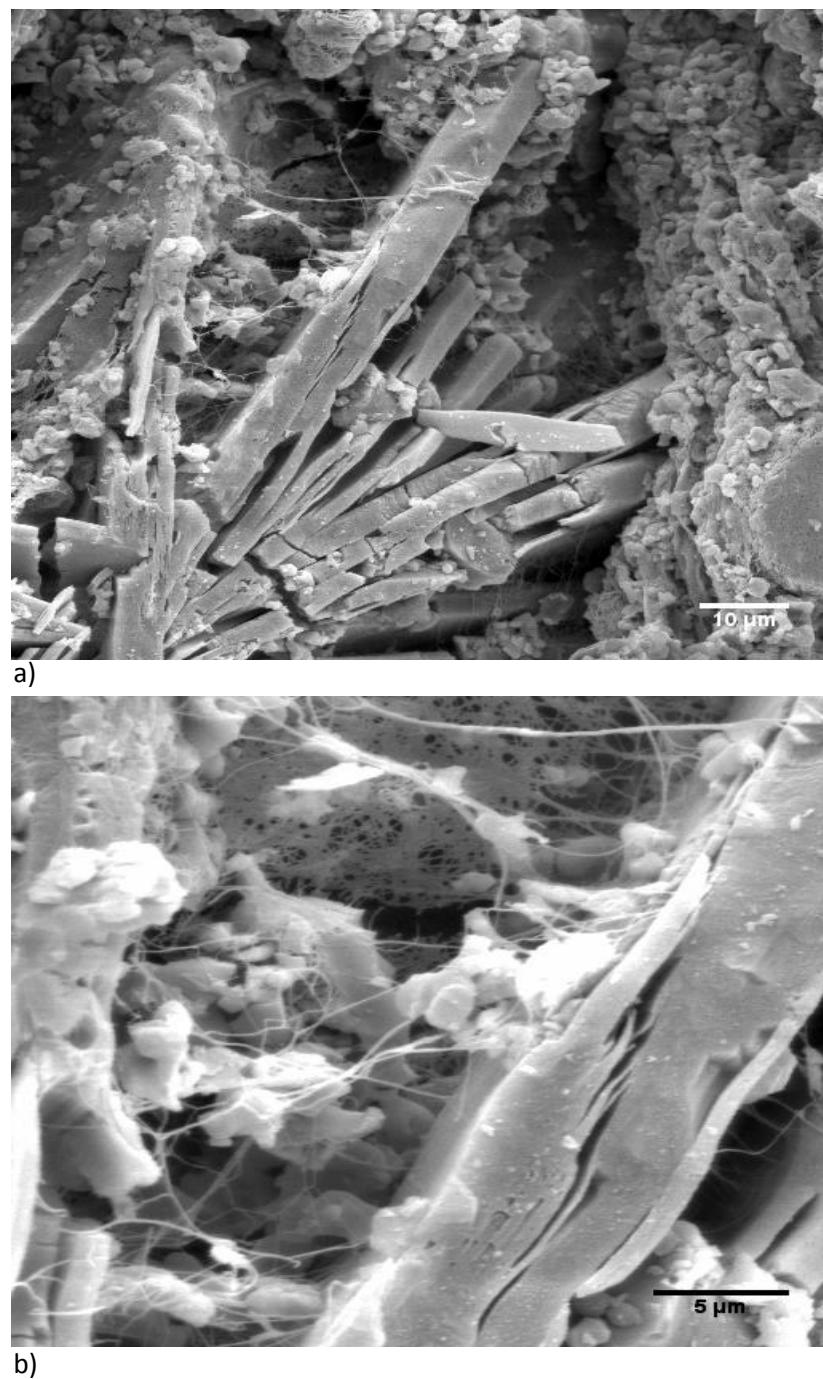
Fonte: Elaborada pelo autor

A estrutura morfológica da CB produzida pela *G. hansenii* foi caracterizada por uma orientação aleatória de nanofibrilas, com diâmetro médio de 90 nm, interconectadas entre si, formando, após secagem em estufa, uma estrutura tridimensional compacta. Contudo, pode-se visualizar que sua estrutura morfológica não é de todo uniforme. Há áreas que revelam a presença de agregados de estruturas fibrilares e outras onde as fibras estão mais dispersas e onde a matriz é, por isso, mais porosa. Acredita-se que esta organização possa ser resultante do processo de secagem. Em estufa, a remoção de água da matriz 3D resulta na aproximação das nanofibras que irão se agregar através da formação de pontes de hidrogênio. Sendo a organização tridimensional destas fibras aleatória, a sua agregação também o será, resultando neste efeito de regiões mais agregadas de fibras e outras mais dispersas (NUNES, 2012). Ainda assim, essa estrutura nanométrica propicia uma grande área superficial para a estabilização de partículas (MENDES *et al.*, 2009).

Adicionalmente, a nanomorfologia única da CB resulta numa elevada capacidade de retenção de água, que é um indicativo de uma área superficial também elevada e que implica uma alta capacidade de adsorção de biomoléculas (NUNES, 2012).

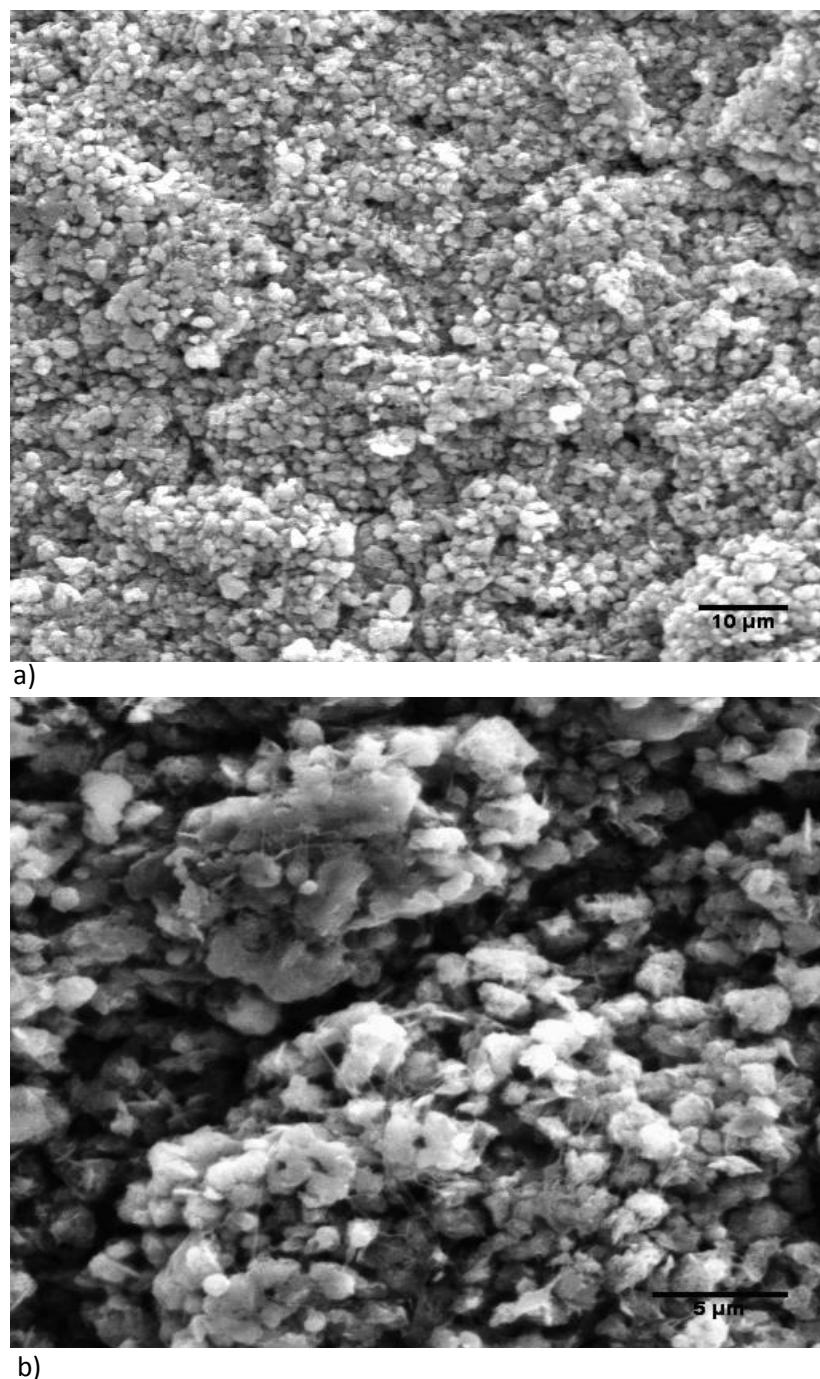
As Figuras 23, 24 e 25 mostram imagens dos nanocompósitos CB-HA secos. Foram observados cristais de HA típicas na forma globular e de haste (FIGURA 23a), semelhantes aos cristais de HA também observados por outros autores (MOREJÓN-ALONSO *et al.*, 2007; MOREJÓN-ALONSO; CARRODEGUAS; GARCÍA-MENOCAL, 2008; SASKA *et al.*, 2011). Cristais de HA foram precipitados sobre as nanofibrilas de CB como aglomerados de cristalitos e poros distribuídos regularmente na superfície da membrana (FIGURA 24a).

Figura 23 - Fotomicrografias do compósito CB-HA (a) aumento de 1000x (b) aumento de 3000x



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 24 - Fotomicrografias do compósito Caju-HA (a) aumento de 1000x (b) aumento de 3000x



Fonte: Elaborada pelo autor

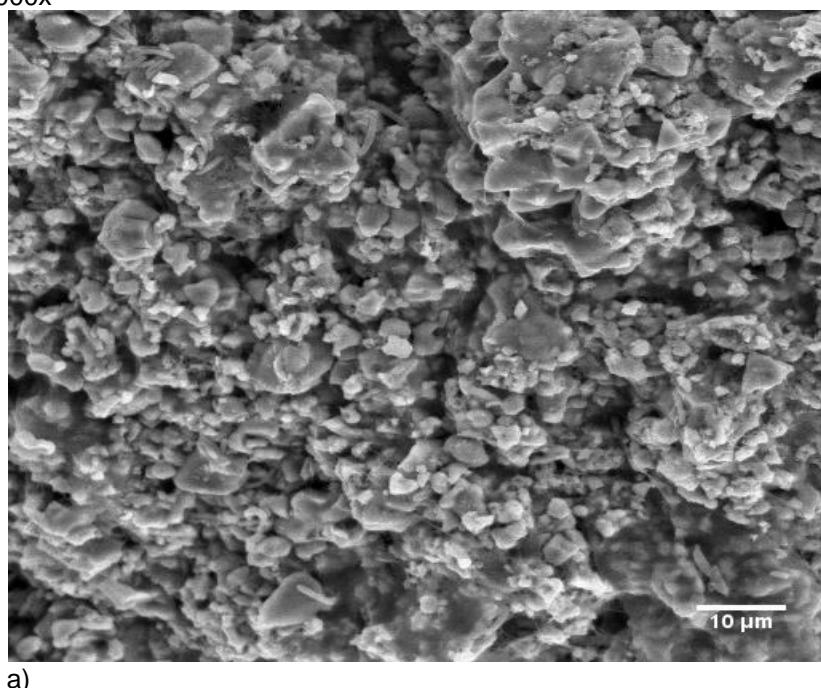
Em função das micrografias, combinadas ao método de preparação dos compósitos e aos resultados DRX, FTIR e EDS, acredita-se que a hidroxiapatita depositada seja cálcio-deficiente, que é uma fase semelhante à apatita biológica. Essa fase é desejável por viabilizar a proliferação dos osteoblastos, que são células responsáveis pela síntese dos componentes

orgânicos da matriz óssea (LE GUÉHENNEC *et al.*, 2004; MISCH, 2006; SASKA *et al.*, 2011).

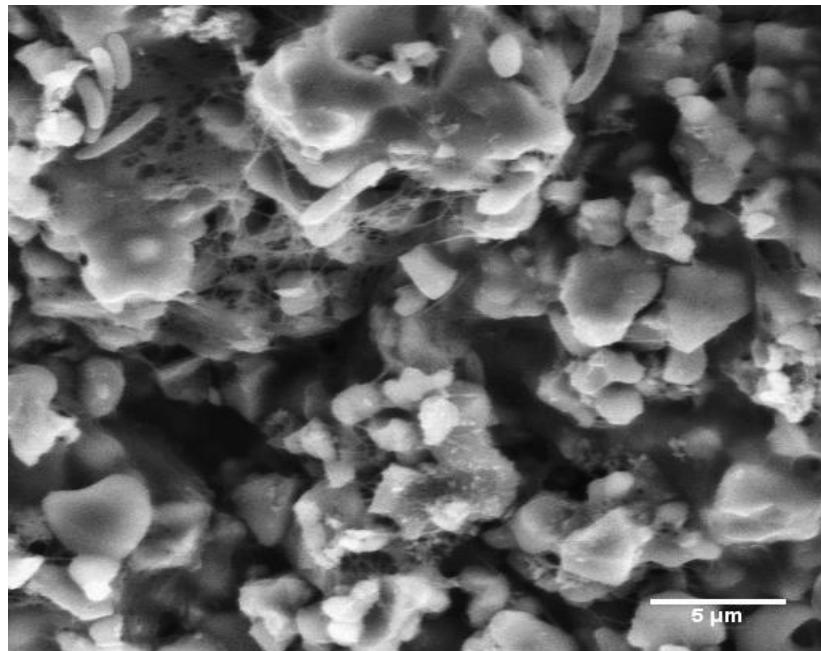
Visualmente, percebe-se o caráter nanométrico das fibras de celulose. Principalmente, quando se considera o maior aumento (3.000x) e a escala reduzida (5 $\mu\text{m}$ ). Através de medições realizadas a partir do programa ImageJ, obteve-se valor médio de espessura das fibras de 90 nm, o que está de acordo com trabalho de Huang *et al.* (2014), segundo o qual a espessura das fibras de celulose produzidas por *G. hansenii*, pode variar de 40 a 100 nm.

Quanto à hidroxiapatita, embora essa apresente uma maior distribuição de tamanho de partículas (FIGURA 25a), há predominância na microescala ( $\cong 2\mu\text{m}$ ).

Figura 25 - Fotomicrografias do compósito Sisal-HA (a) aumento de 1000x (b) aumento de 3000x



a)



b)

Fonte: Elaborada pelo autor

As diferentes imagens de micrografia eletrônica confirmaram a estrutura tridimensional característica da CB, bem como a ausência de contaminantes, não existindo diferenças significativas entre as membranas obtidas com os diferentes meios.

## 5.5. Estudo *in Vitro*

### 5.5.1. Estudo de Degradação *in Vitro* dos Materiais Compósitos

A ANOVA consiste de um teste usado para comparar a média aritmética de grupos amostrais através da análise de variâncias. Para realização do teste, consideram-se duas hipóteses:

$H_0$ : Todas as médias dos grupos amostrais são iguais.

$H_1$ : Pelo menos uma das médias é diferente.

A estatística usada para teste é  $F = \frac{\text{variação entre grupos}}{\text{variação dentro dos grupos}}$

Se o valor observado ( $F$ ) for menor que o valor crítico ( $F_{CRÍTICO}$ ), a hipótese  $H_0$  não pode ser rejeitada. Caso contrário, se  $F$  for maior que o valor crítico ( $F_{CRÍTICO}$ ), rejeita-se  $H_0$ .

Também se deve levar em consideração, a probabilidade de a hipótese nula ser verdadeira, determinada pelo p-value (valor-P), e o nível de significância do teste ( $\alpha$ ). Para este teste, a significância deve ser maior que 0,05 ou 5%. Se p-value for maior que  $\alpha$ , não podemos rejeitar  $H_0$ . Caso contrário, se p-value for menor que  $\alpha$ , rejeitamos  $H_0$ .

No presente estudo, pretende-se demonstrar que não houve diferenças significativas entre as massas médias tomadas antes e após a realização do experimento. Ou, em outras palavras, que não ocorreu dessorção significativa de apatita, após imersão dos compósitos na solução salina e nas condições do teste (30 dias, 37°C). Portanto, não queremos rejeitar  $H_0$ .

As TABELAS 11, 12 e 13, abaixo, reproduzem os valores médios e as respectivas variâncias das massas (g) analisadas para cada compósito.

Tabela 11 - Análise de variância para o compósito HS-HA

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância		
Massa inicial	3	0,0360	0,012000	1,03E-06		
Massa final	3	0,0364	0,012133	2,53E-07		
<b>ANOVA</b>						
Fonte de variação	SQ	GI	MQ	F	Valor-P	F crítico
Entre grupos	2,67E-08	1	2,67E-08	0,041558	0,848415	7,708647
Dentro dos grupos	2,57E-06	4	6,42E-07			
Total	2,59E-06	5				

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 12 - Análise de variância para o compósito Caju-HA

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Massa inicial	3	0,0383	0,012767	3,33E-09
Massa final	3	0,0384	0,012800	4,00E-08
<b>ANOVA</b>				
<i>Fonte de variação</i>				
Entre grupos	SQ	GI	MQ	<i>F</i>
Entre grupos	1,67E-09	1	1,67E-09	0,076923
Dentro dos grupos	8,67E-08	4	2,17E-08	
Total	8,83E-08	5		

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 13 - Análise de variância para o compósito Sisal-HA

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Massa inicial	3	0,0253	0,008433	8,33E-08
Massa final	3	0,0250	0,008333	8,33E-08
<b>ANOVA</b>				
<i>Fonte de variação</i>				
Entre grupos	SQ	GI	MQ	<i>F</i>
Entre grupos	1,5E-08	1	1,50E-08	0,18
Dentro dos grupos	3,33E-07	4	8,33E-08	
Total	3,48E-07	5		

Fonte: Elaborada pelo autor

Nas Tabelas, SQ é a soma dos quadrados de todos os desvios em relação à média de todas as observações (entre e dentro dos grupos), gl são os graus de liberdade e MQ é a média quadrática (entre e dentro dos grupos).

Observa-se que, para todos os tratamentos realizados, o valor-P é maior que  $\alpha$  (0,05). Neste caso, não se rejeita a hipótese  $H_0$ , de modo que não há diferenças significativas entre as medidas das massas. Chegaríamos à mesma conclusão comparando-se F com  $F_{CRÍTICO}$ . Como o valor observado F é sempre menor que o  $F_{CRÍTICO}$ ,  $H_0$  não é rejeitada.

O resultado demonstra também a eficiência da lavagem que antecede o processo de secagem. À medida que as películas são lavadas para remoção das soluções ainda impregnadas no material, as partículas não

ligadas ou fracamente unidas são arrastadas deixando apenas aquelas que estão mais fortemente unidas à superfície e à matriz interna dos filmes de CB (UI-ISLAM, 2014).

### 5.5.2. Bioatividade

Os compósitos obtidos foram observados quanto à habilidade de induzir a nucleação de apatita, quando submetidos ao teste de bioatividade em fluido corpóreo simulado (SBF). A bioatividade de um material se refere à sua capacidade de desenvolver uma ligação estável com tecidos vivos via deposição de hidroxiapatita (CZARNECKA *et al.*, 2008; OLIVEIRA; PANDOLFELLI, 2011). Em geral, a precipitação de HA na superfície de um material exposto à solução SBF *in vitro* fornece uma indicação se o material é bioativo. O SBF pode ser usado não apenas para avaliar a bioatividade de materiais artificiais *in vitro*, mas também recobrir com apatita vários materiais sobre condições biomiméticas (KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

O experimento foi realizado por 14 dias, período após o qual as amostras foram retiradas do SBF e postas para secar. Elas foram avaliadas segundo diferenças de massa tomadas antes e depois do experimento e através de visualizações no MEV.

A TABELA 14 apresenta as massas percentuais de hidroxiapatita ( $m\%$ ) depositadas sobre os compósitos mediante o teste de bioatividade. Os cálculos foram feitos com auxílio da Equação (7).

Tabela 14 - Massa percentual de hidroxiapatita depositada após teste de bioatividade

Compósito	$m\% \text{ HA}$
HS-HA	$17,7 \pm 0,5$
Caju-HA	$23,0 \pm 1,4$
Sisal-HA	$22,5 \pm 5,9$

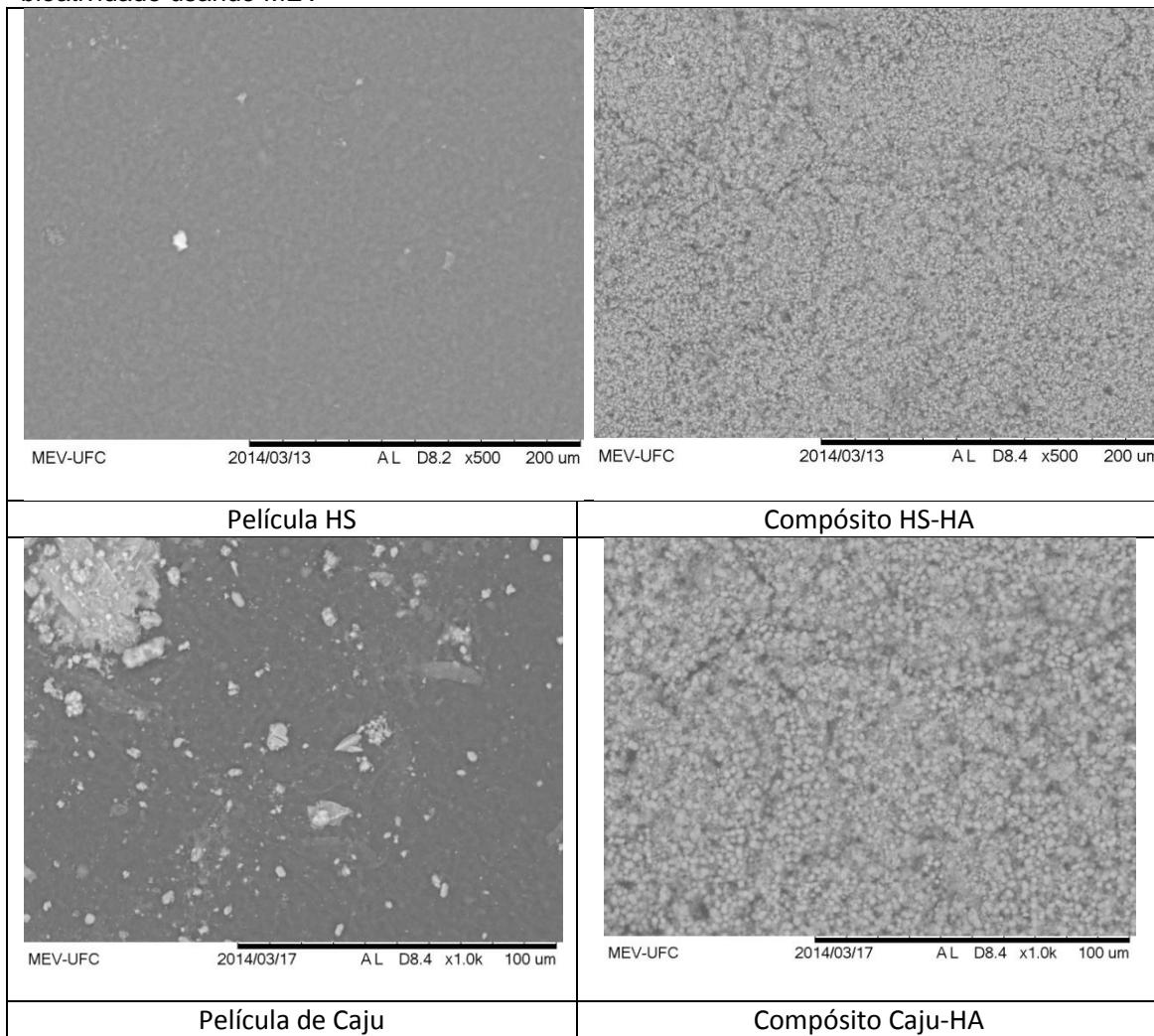
Fonte: Elaborada pelo autor

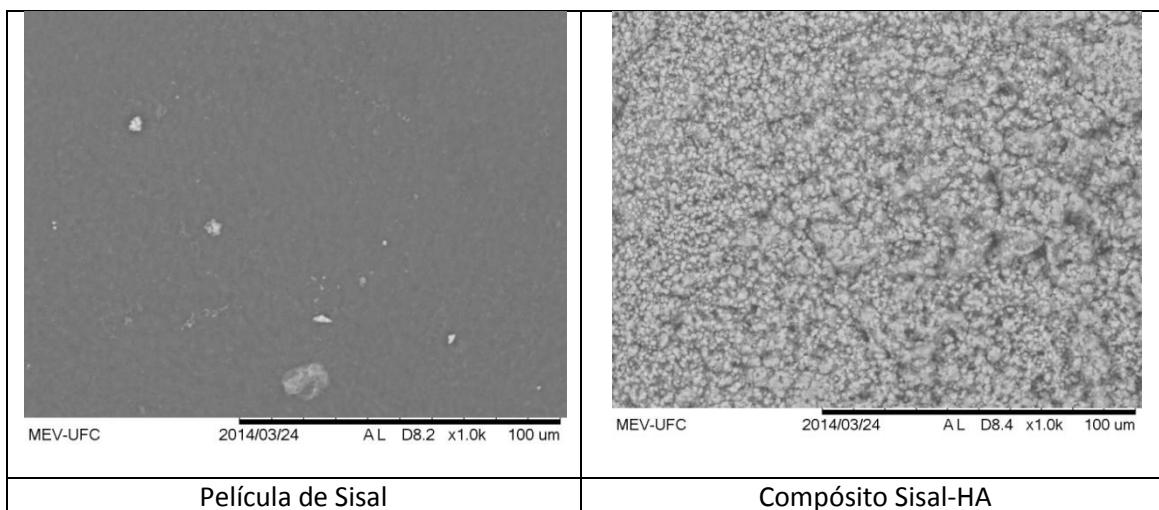
A formação de uma camada de apatita sobre o compósito em um curto período de tempo (14 dias) está de acordo com a literatura. Segundo Chern Lin *et al.* (2001) e Hutchens (2007), a cdHA, originalmente formada sobre a celulose durante os ciclos de imersão, permite a deposição imediata da

camada biomimética de apatita em sua superfície, o que favorece a ligação rápida com o osso quando implantada em um organismo vivo.

Para as películas puras, que foram utilizadas como controle, também ocorreu deposição, porém em menor extensão, como pode ser observado nas micrografias da FIGURA 26. Em geral, a deposição no compósito foi até 3x maior do que a deposição de apatita observada sobre a celulose pura.

Figura 26 - Imagens comparativas de filmes de CB e compósitos CB-HA após teste de bioatividade usando MEV





Fonte: Elaborada pelo autor

A formação da camada de HA na superfície dos materiais compósitos em contato com a solução de fluido corporal simulado atesta sua bioatividade. Materiais que exibem esta propriedade podem ser usados para reparar doenças ou danos no tecido ósseo e podem permanecer *in situ* indefinidamente (COLEMAN *et al.*, 2007; OLIVEIRA; PANDOLFELLI, 2011).

### **5.5.3. Adsorção de Proteína**

Quando um material estranho entra em contato com o organismo, imediatamente ocorre a adsorção de proteínas à sua superfície e a camada proteica adsorvida passa a determinar eventos futuros como adesão de plaquetas, agregação ou resposta inflamatória (MACHADO, 2007). A resposta do tecido aos materiais implantados surge principalmente das diferenças na adsorção das proteínas que, por sua vez, dependem de parâmetros de superfície, composição química e rugosidade, entre outras (TALLARICO *et al.*, 2012).

Os fenômenos físico-químicos que ocorrem na superfície da interface osso/implante determinam as respostas biológicas após a implantação dos biomateriais e, portanto, são fundamentais para a eficácia do processo de osseointegração. Entretanto, alguns biomateriais com propriedades mecânicas adequadas não possuem um bom desempenho em

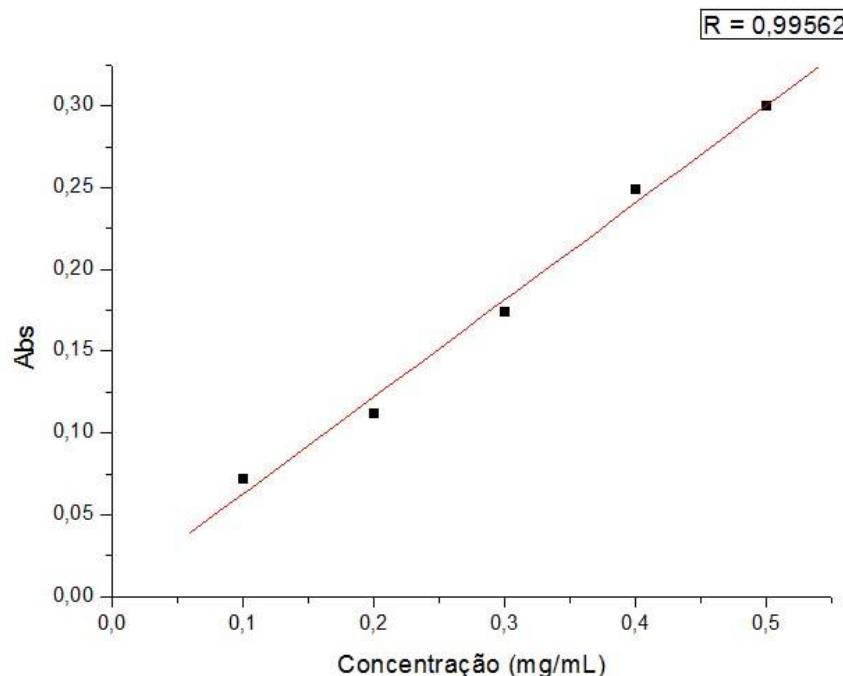
algumas características de superfície importantes para aplicações clínicas como, por exemplo, a citotoxicidade (TALLARICO *et al.*, 2012).

Os modelos de culturas celulares *in vitro*, que favorecem a interação biomaterial/célula, têm sido usados para o desenvolvimento de novos biomateriais, permitindo estudar as interações célula/material sem a existência de reações concomitantes que acontecem quando um material estranho é implantado *in vivo*. Deste modo, não apenas a citotoxicidade e a biocompatibilidade do material podem ser estudadas, como também eventos específicos tanto das células como dos materiais. Em suma, a adesão celular a biomateriais é considerada como um dos estágios mais importantes na interação célula/material (MACHADO, 2007).

O objetivo principal deste teste foi o de constatar a adsorção de proteínas nas superfícies dos materiais preparados. O trabalho envolveu a adsorção de uma das proteínas chave na adesão celular, a albumina, proveniente de soluções simples preparada em PBS. A albumina é a proteína predominante do plasma e é conhecida como “passivante” das superfícies prevenindo a adesão celular e reduzindo a resposta inflamatória ao material implantado. Daí, sua importância, como fator relevante na biocompatibilidade do material em estudo.

Para determinação da quantidade de BSA adsorvida em cada compósito, procedeu-se inicialmente à elaboração de uma curva padrão partindo-se de concentrações variadas de BSA (0,1-0,5 mg/mL) na solução de PBS, como pode ser visto na FIGURA 27.

Figura 27 - Curva-padrão para proteína BSA em solução de PBS



Fonte: Elaborada pelo autor

A quantidade adsorvida (madsorvida) nos materiais compósitos foi calculada por diferença entre as concentrações inicial e final de BSA em PBS, tomando por base a curva padrão obtida. Observou-se uma diminuição da quantidade estimada de BSA em solução, a qual foi atribuída à adsorção nos compósitos CB-HA. A TABELA 15 sumariza os valores calculados.

Tabela 15 - Quantidade de BSA adsorvida (mg de BSA/ g de compósito)

Compósito	madsorvida (mg/g)
HS-HA	47,7 ± 5,1
Caju-HA	43,4 ± 2,0
Sisal-HA	59,5 ± 3,8

Fonte: Elaborada pelo autor

Com base nos dados da TABELA 15, observa-se que, embora todos os três materiais estudados apresentem biocompatibilidade favorável no que diz respeito à adsorção da proteína, o compósito Sisal-HA é o que apresenta a maior quantidade adsorvida frente aos demais.

## 6. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho reforçaram a possibilidade de uso de resíduos agroindustriais como fontes alternativas para produção de celulose bacteriana. Comprovou-se, através das caracterizações realizadas, que suco de caju e resíduo líquido de sisal podem ser empregados como substratos naturais para a formação de celulose bacteriana via *Gluconacetobacter Hansenii*, sem a necessidade de qualquer suplementação auxiliar. As películas obtidas a partir do resíduo líquido de sisal superaram as expectativas revelando propriedades próximas, ou até superiores, às obtidas a partir do meio de composição definida HS. Embora CB também tenha sido preparada a partir de suco de caju, dificuldades de manuseio e baixas propriedades mecânicas foram observadas nas películas resultantes. Por outro lado, em relação a aspectos de natureza química e microestrutural, as bioceluloses não apresentaram diferenças significativas entre si.

Demonstrou-se a habilidade da celulose bacteriana em fornecer um “template” adequado à formação ordenada de hidroxiapatita deficiente em cálcio, através da elaboração de compósitos. Os compósitos CB-HA foram submetidos às mesmas caracterizações realizadas para as películas de celulose pura. Através dos ensaios mecânicos observou-se que a adição da apatita mudou a estrutura polimérica dos filmes dando-lhe menor resistência, porém maior alongamento. A deposição de hidroxiapatita cálcio-deficiente ocorreu com certa regularidade, ocupando espaços entre as fibras dos biopolímeros, e apresentou comportamento cristalográfico bem próximo à apatita natural ou biológica.

Realizaram-se ainda testes *in vitro* dos materiais compósitos simulando as condições do meio fisiológico, através dos quais se verificou sua integridade estrutural, a capacidade de absorção de proteínas e a bioatividade. Nesta avaliação preliminar, todos os biocompósitos testados mostraram-se aptos ao desenvolvimento de estruturas do tipo *scaffold* para aplicações biomédicas, no que diz respeito à biocompatibilidade e bioatividade.

## Publicações Decorrentes deste Trabalho

NASCIMENTO, R. M.; DUARTE, E. B.; FEITOSA, J.; BORGES, M. F.; MATTOS, A. L.; SOUZA FILHO, M. S. M.; ROSA, M. F. Caracterização preliminar da celulose bacteriana obtida a partir do líquido de sisal. *In: IX ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL*, 2011, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.

GALAS, K. S.; BORGES, M. F.; SILVEIRA, D. B.; DUARTE, E. B.; ROSA, M. F.; BRIGIDA, A. I. S. Avaliação da produção de celulose bacteriana a partir de resíduos agroindustriais. *In: IX ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL*, 2011, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.

GALAS, K. S.; BORGES, M. F.; SILVEIRA, D. B.; DUARTE, E.; GOMES, E. P. C.; BRÍGIDA, A. I. S.; ROSA, M. F. Utilização de resíduos agroindustriais na produção de celulose bacteriana. *In: VI WORKSHOP DA REDE DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO*, 2012, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012. p. 228-230.

DUARTE, E. B.; SILVEIRA, D. B.; GOMES, E. P. C.; NASCIMENTO, E. S.; LIMA, H. L. S.; BORGES, M. F. Caracterização de celulose bacteriana obtida a partir de resíduos agroindustriais. *In: X ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E I ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL*, 2012, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012. p. 118-119.

DUARTE, E. B.; FEITOSA, J. ; ROSA, M. F.; BORGES, M. F.; SOUZA FILHO, M. S. M. Caracterização de celulose bacteriana obtida a partir de resíduos agroindustriais. *In: 20º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E*

CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 2012, Joinville. **Anais...** Joinville: CBECIMAT, 2012. p. 9618-9625.

BORGES, M. F.; BRÍGIDA, A. I. S.; GOTTSCHALK, L. M. F.; ANDRADE, F. K. ; BATISTA, E. ; LIMA, H. L. S.; NASCIMENTO, E. S.; SOUZA, E. F.; TERZI, S. C.; PENHA, E. M.; SILVA, J. P. L.; FILHO, M. S. M. S.; OLIVEIRA, E. M. M.; ROSA, M. F. Production of bacterial cellulose using *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC 1431) strain in synthetic medium. *In:* 1ST INTERNATIONAL CONFERENCE ON NATURAL FIBER, 2013, Guimarães. **Book of Abstracts...** Guimarães: University of Minho, 2013. p. 61-62.

## Referências

- ABEER, M. M.; AMIN, M. C. I. M.; MARTIN, C. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: their biochemistry, current approaches and future prospects. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2014.
- ALABAN, C. A. Studies on the optimum conditions for "nata de coco" bacterium or "nata" formation in coconut water. **Philippine Agriculturist**, v. 45, p. 490-516, 1962.
- ALMEIDA, A. T. **Obtenção de superfícies hemocompatíveis por meio da modificação de materiais poliméricos pela radiação ionizante**. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- ALMEIDA, D. M.; WOSIACKI, G.; SANTOS JUNIOR, G.; MADALOZZO, E. S.; ZANLORENZI, M. M. Crescimento do *Acetobacter xylinum* (ATCC 23769) e a produção de celulose bacteriana. **Revista brasileira de tecnologia agroindustrial**, v. 2, p. 9, 2008.
- ALVES-REZENDE, M. C. R.; DEKON, S. F. C.; GRANDINI, C. R.; BERTOZ, A. P. M.; ALVES-CLARO, A. P. R. Tratamento de superfície de implantes dentários: SBF. **Rev Odontol**, v. 32, p. 38-43, 2011.
- ANDRADE, M.; PARRA, J. B.; HARO, M.; MESTRE, A. S.; CARVALHO, A. P.; ANIA, C. O. Characterization of the different fractions obtained from the pyrolysis of rope industry waste. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 95, p. 31-37, 2012.

ANGELE, P.; ABKE, J.; KUJAT, R.; FALTERMEIER, H.; SCHUMANN, D.; NERLICH, M.; KINNER, B.; ENGLERT, C.; RUSZCZAK, Z.; MEHRL, R.; MUELLER, R. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. **Biomaterials**, n. 25, p. 2831-2841, 2004.

ARAÚJO, T. S. **Produção de hidroxiapatita pura e dopada para aplicação em biosensores**. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal de Sergipe, 2006.

BARUD, H. S. **Preparo e caracterização de novos compósitos de celulose bacteriana**. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara, 2006.

BARUD, H. S.; RIBEIRO, C. A.; CRESPI, M. S.; MARTINES, M. A. U.; DEXPERT-GHYS, J.; MARQUES, R. F. C.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Thermal characterization of bacterial cellulose-phosphate composite membranes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 3, p. 815-818, 2007.

BARUD, H. S.; BARRIOS, C.; REGIANI, T.; MARQUES, R. F. C.; VERELST, M.; DEXPERT-GHYS, J.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p. 515-518, 2008.

BARUD, H. S. **Novos materiais multifuncionais baseados em celulose bacteriana**. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara, 2010.

BIELECKI, S.; KRYSZTYNOWICZ, A.; TURKIEWICZ, M.; KALINOWSKA, H. Bacterial Cellulose. **Biopolymers Online**, v 5, p. 37-85, 2005.

BOHNER, M.; LEMAITRE, J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? **Biomaterials**, v. 30, n. 12, p. 2175-2179, 2009.

BROWN, A. J. An acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical Society**, v.49, p.432-439, 1886.

ÇAKAR, F.; OZER, I.; AYTEKIN, A. O.; SAHIN, F. Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. **Carbohydrate Polymers**, v.106, p. 7-13, 2014.

CARREIRA, P.; MENDES, J. A. S.; TROVATTI, E.; SERAFIM, L. S.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 15, p. 7354-7360, 2011.

CAVKA, A.; GUO, X.; TANG, S.; WINESTRAND, S.; JÖNSSON, L. J.; HONG, F. Production of bacterial cellulose and enzyme from waste fiber sludge. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 25, 2013.

CHERN LIN, J. H.; KUO, K. H.; DING, S. J. Surface reaction of stoichiometric and calcium-deficient hydroxyapatite in simulated body fluid. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 12, p. 731-741, 2001.

COSTA, A. C. F. M.; LIMA, M. G.; LIMA, L. H. M. A.; CORDEIRO, V. V.; VIANA, K. M. S.; SOUSA, C. V.; LIRA, H. L. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. Universidade Federal de Campina Grande - PB. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.4.3, p. 29-38, 2009.

COSTA, S. M.; ROGERO, S.; LUGÃO, A. B. Hydrogel membranes of PVP (poly-vinyl pyrrolidone) and bacterial cellulose. In: 6th International Symposium on Natural Polymers and Composites, Gramado, 2007.

CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL. R. S. Fermentative Production of Microbial Cellulose, **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107-124, 2009.

COLEMAN, N. J.; NICHOLSON, J. W.; AWOSANYA, K. **Cement and Concrete Research**, v. 37, p. 1518-1523, 2007.

CUNHA, M. A. **Síntese e Caracterização de Hidroxiapatita nanoestruturada obtidos por aspersão de solução em chama**. Trabalho de Diplomação - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN, R.M. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. **Cellulose**, v. 11, p. 403-411, 2004.

CZARNECKA, B.; COLEMAN, N. J.; SHAW, H.; NICHOLSON, J. W. **Dental Medical Problems**, v. 45, p. 5-11, 2008.

DANESI, E. D. G.; WOSIACKI, G. Otimização da produção de nata (celulose bacteriana) por fermentação em superfície. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 1, 1998.

DANTAS, E. M.; AQUINO; L. C. L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p. 81-87, 2010.

DEMELLO, J. A. **Bacterial cellulose templates for nano-hydroxyapatite fibre synthesis**. Electronic thesis and dissertation repository. University of Western Ontario, 2012.

DONINI, I. A. N.; DE SALVI, D. T. B.; FUKUMOTO, F. K.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MARCHETOO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, 2010.

DRUZIAN, J. I.; PAGLIARINI, A. P. Produção de goma xantana por fermentação do resíduo de suco de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 26-31, 2007.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Nanobiotechnology: platform technology for biomaterials and biological applications the nanostructures. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, 2012.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432-1442, 2013.

GEA, S.; REYNOLDS, C. T.; ROOHPOUR, N.; WIRJOSENTONO, B.; SOYKEABKAEW, N.; BILOTTI, E.; PEIJS, T. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9105-9110, 2011.

GEORGE, J.; RAMANA, K. V.; SABAPATHY, S. N.; JAGANNATH, J. H.; BAWA, A. S. Characterization of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) biopolymer: Some thermo-mechanical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.37, n.4, p.189-194, 2005.

GOMES, F. P.; SILVA, N. H. C. S.; TROVATTI, E.; SERAFIM, L. S.; DUARTE, M. F. ; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P.; FREIRE, C. S.R. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue, **Biomass and Bioenergy**, v. 55, p. 205-211, 2013.

GOTTSCHALK, L. M. F.; BRÍGIDA, A. I. S.; PENHA, E. M.; SILVA, J. P. L.; SOUZA, E.F.; TERZI, S.C.; VIANA, L.A.N.; OLIVEIRA, E.M.M. Avaliação da fonte de nitrogênio na produção de celulose bacteriana pela cepa *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 1431 em meio sintético. In: XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, Foz do Iguaçu, PR, 2013.

GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A; GOMES, E.R.S. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1-22, 2008.

GRANDE, C. J.; TORRES, F. G.; GOMEZ, C. M.; BAÑO, M. C. Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications, **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 1605-1615, 2009.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.

GROMET, Z.; SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 4. Enzyme systems present in a crude extract of glucose-grown cells. **Biochemical Journal**, v.67, n.4, p.679-89, 1957.

HARTGERINK, J. D.; BENIASH, E.; STUPP, S. I. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. **Science**, v. 294, p. 1684-1688, 2001.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Micromethod for the determination of celluloses. **Biochemical Journal**, v. 56, p. 163-166, 1954.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemical Journal**, v.58, n.2, p.345-52, 1954b.

HOENICH, N. Cellulose for medical applications: past, present and future. **BioResources**, v. 1, n. 2, p. 270-280, 2006.

HONG, L.; WANG., Y. L.; JIA, S. R.; HUANG, Y.; GAO, C.; WAN, Y. Z. Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route. **Materials Letters**, v. 60, p. 1710-1713, 2006.

HU, W.; CHEN, S.; YANG, J.; LI, Z.; WANG, H. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1043-1060, 2014.

HUANG, Y.; ZHU, C.; YANG, J.; NIE, Y.; CHEN, C.; SUN, D. Recent advances in bacterial Cellulose. **Cellulose**, v. 21, p. 1-30, 2014.

HUTCHENS, S. A.; BENSON, R. S.; EVANS, B. R.; O'NEILL, H. M.; RAWN, C. J. Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel. **Biomaterials**, n. 27, p. 4661-4670, 2006.

HUTCHENS, S. A. **Characterization of a Biomimetic Calcium-Deficient Hydroxyapatite-Bacterial Cellulose Composite**. PhD dissertation., University of Tennessee, 2007.

JEON, J. H.; OH, I. K.; KEE, C. D.; KIM, S. J. Bacterial cellulose actuator with electrically driven bending deformation in hydrated condition. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 146, n. 1, p. 307-313, 2010.

JUNG, R.; KIM, H-S.; KIM, Y.; KWON, S-M.; LEE, H. S.; JIN, H-J. Electrically conductive transparent papers using multiwalled carbon nanotubes. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 46, n. 12, p. 1235-1242, 2008.

JUNIOR, P. E. S. J.; ORÉFICE, R. L. Compósitos bioativos obtidos a partir da inserção de vidro bioativo em matriz de poli(metacrilato de metila). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 3, p. 109-115, 2001.

KESHK, S.M.A.S.; SAMESHIMA, K. Evaluation of Different Carbon Sources for the Production of Bacterial Cellulose. **African Journal of Biotechnology**, v. 4 n. 6, p. 478, 2005.

KLEMM, D. **Comprehensive Cellulose Chemistry: Fundamentals and Analytical Methods**, Wiley-VCH, 1998.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 1561-603, 2001.

KOKUBO, T. Bioactive glass ceramics: properties and applications, **Biomaterials**, v. 12, p. 155-163, 1991.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907-2915, 2006.

LAMAS, N. S. **Desenvolvimento, Caracterização e Uso de Marcadores Microssatélites no Mapeamento Genético de Características Agronômicas de Cajeiro (Anacardium occidentale L.)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade de Brasília - Instituto de Biologia - Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, 2010.

LE GUÉHENNEC, L.; LAYROLLE, P.; DACULSI, G.; REDL, H.; PANDIT, A.; CZERNUSZKA, J. A review of bioceramics and fibrin sealant. **European Cells and Materials**, v. 8, p. 1-10, 2004.

LEE, K.; BULDUM, G.; MANTALARIS, A.; BISMARCK, A. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, p. 10-32, 2014.

LI, J.; WAN, Y.; LI, L.; LIANG, H.; WANG, J. Preparation and characterization of 2,3-dialdehyde bacterial cellulose for potential biodegradable tissue engineering scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 1635-1642, 2009.

LICKORISH, D.; RAMSHAW, J.A.M.; WERKMEISTER, J.A.; GLATTAUER, V.; HOWLETT, C.R. Collagen-hydroxyapatite composite prepared by biomimetic process. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 68A, p. 19-27, 2004.

LIMA, H. L. S. **Avaliação do potencial do líquido de sisal e do suco de caju para a produção de celulose bacteriana** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

LIU, Q.; DING, J.; MANTE, F. K.; WUNDER, S. L.; BARAN, G. R. The role of surface functional groups in calcium phosphate nucleation on titanium foil: a self-assembled monolayer technique. **Biomaterials**, v.23, n.15, p. 3103-11. 2002.

LUCIA, L.; ROJAS, O. **The Nanoscience and Technology of Renewable Biomaterials**. Wiley-Blackwell, 366 p., 2009.

LUO, H.; XIONG, G.; HUANG, Y.; HE, F.; WANG, Y.; WAN, Y. Preparation and characterization of a novel COL/BC composite for potential tissue engineering scaffolds. **Materials Chemistry and Physics**, v.110, p. 193-196, 2008.

MACHADO, H. B. P. **Suportes compósitos poliuretano/HA para aplicações ósseas de longo termo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro (DECV), Universidade de Aveiro, 2007.

MADALOZZO, E. S.; ALMEIDA, D. M.; JUNIOR, G. DOS S.; LEAL, E. S.; CARNEIRO, P. I. B. Obtenção de cepas de *Acetobacter xylinum* a partir da folha de capim-limão in natura, Série em Ciência e Tecnologia de Alimentos: agroindústria, energia e meio ambiente - Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Ponta Grossa, Paraná, v. 2, n. 12, 2008.

MANTANIS, G. I.; YOUNG, R. A.; ROWELL, R. M. Swelling of compressed cellulose fiber webs in organic liquids. **Cellulose**, v.2, n.1, p.1-22. 1995.

MATIAS, F. **Caracterização de linhagens bacterianas isoladas da biodiversidade brasileira quanto à produção de biopolímeros. Tese (Doutorado em Biotecnologia)** - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, 2009.

MEIRA, V. C. R. S. **Preparação e caracterização de filmes de amido modificado por reticulação, acetilação e com adição de lipídio e celulose bacteriana.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MENDES, P. N.; RAHAL, S. C.; PEREIRA-JUNIOR, O. C. M.; FABRIS, V. E.; LENHARO, S. L. R.; DE LIMA-NETO, J. F.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. In vivo and in vitro evaluation of an *Acetobacter xylinum* synthesized microbial cellulose membrane intended for guided tissue repair, **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, n. 12, 2009.

MISCH, C. E. **Implantes Dentários Contemporâneos**, Santos, São Paulo, Brasil, 2<sup>a</sup> Edição, 2006.

MOREJÓN-ALONSO, L.; CARRODEGUAS, R. G.; GARCÍA-MENOCAL, J. A. D.; PÉREZ, J. A. A.; MANENT, S. M. Effect of sterilization on the properties of CDHA-OCP- $\beta$ -TCP biomaterial, **Materials Research**, v. 10, n. 1, p. 15-20, 2007.

MOREJÓN-ALONSO, L.; CARRODEGUAS, R. G.; GARCÍA-MENOCAL, J. A. D. Transformations in CDHA/OCP/ $\beta$ -TCP scaffold during ageing in simulated body fluid at 36.5°C, **Journal of Biomedical Materials Research Part B**, v. 84B, n. 2, p. 386-393, 2008.

MORMINO, R. P. **Evaluation and applications of a rotating disk reactor producing bacterial cellulose**. 130 f. Thesis (Chemical Engineering), Faculty of Rensselaer Polytechnic Institute, New York, 2002.

MOVASAGHI, Z., REHMAN, S., REHMAN, I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, p. 134-179, 2008.

NOGUEIRA, D. A. R. **Adsorção de proteínas na superfície de biomateriais poliméricos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

NOGUEIRA, J. P.; PIRAS, P. R. F. Prospecção para a produção de leveduras e etanol a partir do suco de sisal. **Anais do XV Semic**. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2011.

NUNES, A. S. C. **Bacterial cellulose as a nanostructured functional material for biomedical applications**. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Minho, 2012.

OH, S. Y.; YOO, D. I.; SHIN, Y.; KIM, H.C.; KIM, H. Y.; CHUNG, Y. S.; PARK, W. H.; YOUNG, J. H. Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2376-2391, 2005.

OLIVEIRA, I. R.; PANDOLFELLI, V. C. Propriedades e bioatividade de um cimento endodôntico à base de aluminato de cálcio. **Cerâmica**, v. 57, p. 364-370, 2011.

OLIVEIRA, V. A.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Produção e degradação in vitro de estruturas tubulares de celulose bacteriana. **Polímeros**, v. 23, n.4, 2013.

PERTILE, R. A. N. **Estudo *in vitro* da interação da linhagem de fibroblastos L929 com membrana de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2007.

PINEDA, L. D. C.; MESA, L. A. C.; HABERT, A. C. Effect of culture and purification conditions on physicochemical and transport properties in bacterial cellulose membranes. **Chemical Engineering Transactions**, v. 20, p. 327-332, 2010.

PINEDA, L. D. C.; MESA, L. A. C.; RIASCOS, C. A. M. Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. **Ingenieria y Ciencia**, v.8, n. 16, p. 307-335, 2012.

PINHEIRO, A. D. T. **Fermentação alcoólica do suco de caju (*Anacardium Occidentale* L.): influência de condições operacionais.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

PINHO, L. X. **Aproveitamento do resíduo do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) para alimentação humana.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2009.

QUEIROZ, P. V. S. **Desenvolvimento, caracterização e aplicação de membranas à base de celulose bacteriana e do nanocompósito celulose bacteriana/policaprolactona na ceratoplastia lamelar experimental em coelhos.** Dissertação (Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SHOEM, F.J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials science - an introduction to materials medicine.** USA: Academic, p. 228, 1996.

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

RECOUVREUX, D. O. S.; RAMBO, C. R.; CARMINATTI, C. A.; BERTI, F. V.; ANTONIO, R. V.; PORTO, L. M. Compósito multicamadas de hidroxiapatita e nanocelulose bacteriana. *In:* XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, v. 1 (CD), p. 1-4, 2008.

RIBEIRO, G. B. M. **Obtenção de biomateriais porosos utilizando sílica coloidal como aglutinante.** Trabalho de Diplomação - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Escola de Engenharia - Engenharia de Materiais, 2009.

RIGO, E. C. S.; GEHRKE, S. A.; CARBONARI, M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. **Revista Dental Press de Periodontia e Implantologia**, v. 1, n. 3, p. 39-50, 2007.

ROMAN, M.; WINTER, W. T. Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose. **Biomacromolecules**, v.5, n. 5, p. 1671-1677, 2004.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria, **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 35-58, 1991.

SALEH, J.; WILLKE, L. W.; BASSANI, I. A.; KRAETHER, L.; MOLZ, R. F.; SANTOS, L. A. **Obtenção e avaliação de hidroxiapatita *in vivo*.** In: XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2004.

SANTANA, M. F. S.; SILVA, I. C. **Elaboração de biscoitos com resíduo da extração de suco de caju.** Comunicado Técnico 214, Belém, PA, 2008.

SANTOS, L. A. **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica.** Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

SANZ, M. M.; RUBIO A. L.; LAGARON, J. M. Optimization of the nanofabrication by acid hydrolysis of bacterial cellulose nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 228-236, 2011.

SASKA, S.; BARUD, H. S.; GASPAR, A. M. M.; MARCETTO, R.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration, **International Journal of Biomaterials**, v. 2011, 2011.

SCHENZEL, K.; FISCHER, S.; BRENDLER, E. New method for determining the degree of cellulose I crystallinity by means of FT Raman spectroscopy. **Cellulose**, v.12, n.3, p. 223-231, 2005.

SHELKE, N. B., JAMES, R., LAURENCIN, C. T.; KUMBAR, S. G. Polysaccharide biomaterials for drug delivery and regenerative engineering. **Polym, Polymers for Advanced Technologies**, v. 25, p. 448-460, 2014.

SHI, S.; CHEN, S.; ZHANG, X.; SHEN, W.; LI, X.; HU, W.; WANG, H. Biomimetic mineralization synthesis of calcium-deficient carbonate-containing hydroxyapatite in a three-dimensional network of bacterial cellulose. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84; p. 285-290, 2009.

SHI, Z.; ZHANG, Y.; PHILLIPS, G. O.; YANG, G. Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids** v. 35, p. 539-545, 2014.

SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J. O.; MILAM, S. B. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v.57, p. 1122-1126, 1999.

SCHRAMM, M.; GROMET, Z.; HESTRIN, S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 3. Substrates and inhibitors. **Biochemical Journal**, v.67, n.4, p.669-79, 1957.

SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. I. Micromethod for the determination of celluloses. **Biochemical Journal**, v.56, n.1, p.163-6, 1954.

SILVA, C. D. **Adsorção de albumina bovina e ácido hialurónico em cerâmicos de titânio**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, 2008.

SILVA, T. R. S. S. **Desenvolvimento de hidrogéis de celulose bacteriana para cultura de células e permeação de biomoléculas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

SOMSUB, S.; AHT-ONG, D. Physical, mechanical, and thermal properties of sisal cellulose biocomposite films. **Advanced Materials Research**, v. 488-489, p. 1016-1020, 2012.

SOSNIK, A.; SEFTON, M.V Semi-synthetic collagen/poloxamine matrices for tissue engineering. **Biomaterials**, n. 26, p. 7425-7435, 2005.

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004.

STUMPF, T. R.; PÉRTILE, R. A. N.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Enriched glucose and dextrin mannitol-based media modulates fibroblast behavior on bacterial cellulose membranes, **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 8, p. 4739-4745, 2013.

SURMA-ŚLUSARSKA, B.; PRESLER, S.; DANIELEWICZ, D.; Characteristics of bacterial cellulose obtained from acetobacter xylinum culture for application in papermaking. **FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe**, v. 16, n. 4, p. 108-111, 2008.

SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L.; BRITTBURG, M.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, v. 26, p. 419-431, 2005.

TALLARICO, D. A.; GOBBI, A. L.; FILHO, P. I. P.; COSTA, M. E. H. M.; GALTAYRIES, A.; NASCENTE, P. A. P. Adsorção de albumina de soro bovino em filmes finos nanoestruturados de TiO<sub>2</sub>, Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e ZrO<sub>2</sub>. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS, Natal, 2012.

TAZI, N.; ZHANG, Z.; MESSADDEQ, Y.; ALMEIDA-LOPES, L.; ZANARDI, L. M.; LEVINSON, D.; ROUABHIA, M. Hydroxyapatite bioactivated bacterial cellulose promotes osteoblast growth and the formation of bone nodules, **AMB Express**, v. 2, 2012.

TURRER, C. L.; FERREIRA, F. P. M. Biomateriais em cirurgia craniomaxilofacial: princípios básicos e aplicações - revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 23, n. 3, p. 234-239, 2008.

UESU, N. Y.; PINEDA, E.A.; HECHENLEITNER, A. A. Microcrystalline cellulose from soybean husk: effects of solvent treatments on its properties as acetylsalicylic acid carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 206, p. 85-96, 2000.

UI-ISLAM, M.; KHATTAK, W. A.; ULLAH, M. W.; KHAN, S.; PARK, J. K. Synthesis of regenerated bacterial cellulose-zinc oxide nanocomposite films for biomedical applications. **Cellulose**, v. 21, p. 433-447, 2014.

VALLET-REGI, M.; RODRIGUEZ-LORENZO, L. M.; SALINAS, A. J.; Synthesis and characterization of calcium deficient apatite. **Solid State Ionics**, 101-103, p. 1279-1285, 1997.

WAN, Y. Z.; HONG, L.; JIA, S.R.; HUANG, Y.; ZHU, Y.; WANG, Y. L.; JIANG, H.J. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-bacterial cellulose nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 66, p. 1825-1832, 2006.

WAN, Y. Z.; HUANG, Y.; YUAN, C.D.; RAMAN, S.; ZHU, Y.; JIANG, H. J.; HE, F.; GAO, C. Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 27, n. 4, p. 855-864, 2007.

WANICHAPICHART, P.; KAEWNOPPARAT, S.; BUAKING, K.; PUTHAI, W. Characterization of cellulose membranes produced by *Acetobacter xylinum*. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 24, p. 855-862, 2002.

WONG, S. S.; KASAPIS, S.; TAN, Y. M. Bacterial and plant cellulose modification using ultrasound irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 280-287, 2009.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. Taxonomic studies of acetic acid bacteria and allied organisms. 11. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16s ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to generic level. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.61, p.1244-1251, 1997.

YAMAMOTO, H.; HORII, F.; HIRAI, A. In situ crystallization of bacterial cellulose II. Influences of different polymeric additives on the formation of cellulose I $\alpha$  and I $\beta$  at the early stage of incubation. **Cellulose**, v. 3, p. 229-242, 1996.

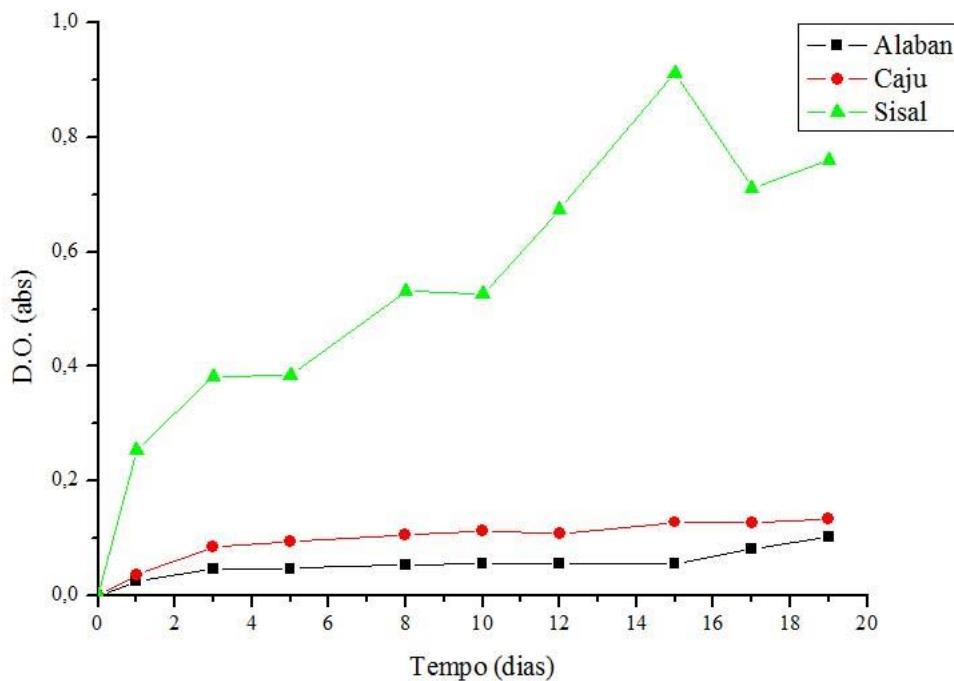
YAN, Z.; CHEN, S.; WANG, H.; WANG, B.; WANG, C.; JIANG, J. Cellulose synthesized by Acetobacter xylinum in the presence of multi-walled carbon nanotubes. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 1, p. 73-78, 2008.

YOSHINAGA F.; TONOUCHI N.; WATANABE K. Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 219-224, 1997.

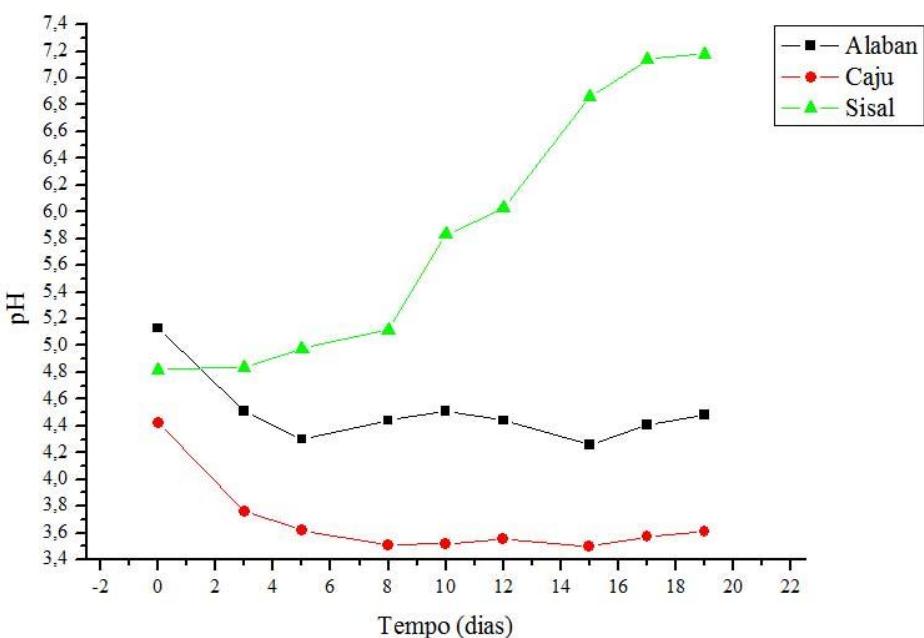
ZABOROWSKA, M.; BODIN, A.; BÄCKDAHL, H.; POPP, J.; GOLDSTEIN, A.; GATENHOLM, P. Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 2540-2547, 2010.

ZIMMERMANN, K. A.; LEBLANC, J. M.; SHEETS, K. T.; FOX, R. W.; GATENHOLM, P. Biomimetic design of a bacterial cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone healing applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 1, p. 43-49, 2011.

## Apêndice A - Dados de Monitoramento da Densidade Ótica e do pH dos Meios de Cultivo



Fonte: Elaborada pelo autor



Fonte: Elaborada pelo autor

## Anexo A - Caracterização Físico-Química do Resíduo Líquido de Sisal e do Suco de Caju Integral

Parâmetro	Líquido de sisal	Suco de caju
Açúcares redutores (g/L)	13,31 ± 0,35	109,11 ± 1,96
Açúcares totais (g/L)	15,05 ± 0,26	107,40 ± 1,90
Glicose (g/L)	12,39 ± 0,01	72,07 ± 0,01
Sacarose (g/L)	1,49 ± 0,01	0,00 ± 0,01
Frutose (g/L)	1,17 ± 0,01	31,80 ± 0,01
Nitrogênio Total (g/L)	0,62 ± 0,17	0,32 ± 0,02
Proteína bruta (g/L)	3,84 ± 1,04	2,01 ± 0,11
pH	4,48 ± 0,01	4,33 ± 0,03
Polifenois (g/L)	1,73 ± 0,04	1,19 ± 0,01
SST (°Brix)	6,83 ± 0,21	11,37 ± 0,06

Fonte: Lima (2014)