



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA - PGEQ

ERIKA PATRÍCIA CHAGAS GOMES LUZ

**DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS HÍBRIDOS À BASE DE CELULOSE
BACTERIANA E/OU HIDROXIAPATITA DOPADOS COM ESTRÔNCIO**

FORTALEZA

2016

ERIKA PATRÍCIA CHAGAS GOMES LUZ

DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS HÍBRIDOS À BASE DE CELULOSE
BACTERIANA E/OU HIDROXIAPATITA DOPADOS COM ESTRÔNCIO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira
Coorientadora: Dra. Maria de Fátima Borges

FORTALEZA
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L994d Luz, Erika Patrícia Chagas Gomes.
Desenvolvimento de materiais híbridos à base de celulose bacteriana e/ ou hidroxiapatita dopados com estrôncio. / Erika Patrícia Chagas Gomes Luz. – 2016.
74 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Rodrigo Vieira Silveira.
Coorientação: Profa. Dra. Maria de Fátima Borges.

1. Materiais híbridos. 2. Celulose bacteriana. 3. Hidroxiapatita. 4. Estrôncio. I. Título.

CDD 660

ERIKA PATRÍCIA CHAGAS GOMES LUZ

DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS HÍBRIDOS À BASE DE CELULOSE
BACTERIANA E/OU HIDROXIAPATITA DOPADOS COM ESTRÔNCIO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Fábيا Karine Andrade
Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA)

Dedico este trabalho a Deus pela força nos momentos difíceis. Ao meu esposo Rennan Luz meu companheiro em todos os momentos, sendo compreensivo e paciente. Aos meus pais Elias e Aparecida pela dedicação e pelo amor que me foi dado. Aos meus irmãos Elizabeth, Elis Cristina e Elias Vitor pelo apoio e amizade. À minha amada sobrinha Giulia, que me proporciona momentos felizes.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Rodrigo Silveira Vieira pela orientação e apoio técnico durante a realização deste trabalho.

À minha coorientadora Dra. Maria de Fátima Borges por sua atenção, carinho e, principalmente, pelas contribuições dadas ao trabalho.

À colaboradora Dra. Morsyleide de Freitas Rosa pela atenção, amizade, apoio e disposição em cooperar no desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da EMBRAPA: Bruna Santana, Elaine Porto e a Régia Sobral que me ajudaram nas atividades diárias.

Ao grupo Grupo de Pesquisa em Separação por Adsorção (GPSA), em nome de Janelene Eloi e Caroline Rodrigues pela disposição e prontidão para me ajudar com a solicitação dos materiais e manutenção dos equipamentos.

A equipe do pré-sal, em especial, minha querida Carol Veloso e Ariane Silveira que compartilharam seus conhecimentos.

À Nataniela Silva e Lucas Amorim, do Laboratório LANAGUA, que me ensinaram operar o equipamento de absorção atômica de forma correta.

Aos amigos Rosiene Arcanjo, Larissa Fiúza, Fernando Barros, Lydiane Souto, Victor Moura e Anaftália Moraes que proporcionaram momentos de descontração.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À EMBRAPA pelo suporte técnico e infraestrutura.

“Biomateriais: O desenvolvimento de um novo
mundo”

(Bruna Felix)

RESUMO

Os materiais híbridos estão sendo amplamente utilizados pelas suas propriedades singulares que têm proporcionado avanços na ciência. O híbrido formado da combinação de celulose bacteriana (CB) e hidroxiapatita (CaHA) tem demonstrado ser um material promissor, principalmente para reparação óssea. A inserção de estrôncio (Sr) em matrizes de CB e CB/CaHA foi escolhido, nesse trabalho, devido a este metal possuir propriedades semelhantes ao cálcio, tendo uma ação similar no corpo humano relacionado aos mecanismos de remodelação óssea. Neste contexto, o presente trabalho propõe obter materiais híbridos à base de celulose bacteriana e/ou hidroxiapatita, dopados com íons estrôncio, usando três diferentes rotas de síntese. A primeira rota consiste na formação de um material híbrido CB/CaHA, onde a hidroxiapatita é formada por fosfatos de cálcio (CaHA), seguido por adsorção em batelada de íons Sr, o que forma o híbrido (CB/CaHA/Sr). Na segunda rota de síntese o híbrido é composto de CB e apatita de estrôncio (CB/SrAp), através de ciclos de imersão da CB em solução de fosfato de sódio dibásico e solução de cloreto de estrôncio. A terceira rota de síntese consiste na inserção de estrôncio no meio de cultivo bacteriano, o que possibilita a formação de um híbrido CB/Sr por co-condensação. Os três biomateriais produzidos foram avaliados e comparados quanto à quantidade adsorvida de Sr^{2+} e quanto ao processo de eluição. A quantidade adsorvida de Sr nos biomateriais nas melhores condições seguiu a seguinte ordem: CB/SrAp > CB/CaHA/Sr > CB/Sr, os quais retiveram 237,31; 29,91; 26,25 mg de Sr por g de material, respectivamente. O CB/CaHA/Sr teve a liberação mais rápida de Sr, com cerca de 80,08% de Sr desorvido após 26h. Obteve-se a isoterma de adsorção desse material e os dados experimentais de equilíbrio foram descritos pelo modelo de Langmuir. Avaliou-se ainda alguns parâmetros sobre a capacidade de adsorção: temperatura e pH. Os outros dois materiais CB/Sr e CB/SrAp, liberaram estrôncio após 26 horas, nas quantidades de 50,64% e 15,76%, respectivamente. Na produção de CB/Sr observou-se que comparativamente a uma amostra controle de CB (sem a adição de estrôncio), ao meio de cultura, há uma perda de rendimento em termos de massa, sugerindo que o Sr causa queda na produção da CB, o que foi corroborado pela queda no consumo de açúcar pelo microrganismo. Os materiais foram caracterizados utilizando as técnicas FTIR, MEV, BET, TGA, determinação de porosidade e grau de intumescimento, a fim compreender a morfologia e interação biopolímero/metal. A partir desses resultados pôde-se inferir que os biomateriais produzidos são capazes de adsorver o estrôncio, mostrando um perfil diferenciado de adsorção/dessorção para cada material, envolvendo tanto mecanismos de fissorção quanto quimissorção.

Palavras-chave: Celulose bacteriana. Hidroxiapatita. Estrôncio. Materiais híbridos.

ABSTRACT

Hybrid materials are widely used due to their unique properties that have provided advance in science. The hybrid produced with the combination of bacterial cellulose (BC) and hydroxyapatite (CaHA) has been shown to be a promising material, especially for bone repair. The insertion of strontium (Sr) in CB/CaHA matrices was chosen due to its similar properties to calcium, with a similar action in the human body related to the bone formation mechanisms. In this context, this study aims to obtain hybrid materials containing bacterial cellulose and/or hydroxyapatite doped with strontium ions, using three different synthesis routes. The first route is the formation of a hybrid material CB/HA, where hydroxyapatite is formed by calcium phosphate (CaHA), followed by batch adsorption of Sr ions, generating the hybrid (CB/CaHA/Sr). In the second route synthesis the hybrid is formed using apatite strontium (SrAp), by CB immersion cycles on dibasic sodium phosphate solution and strontium chloride solution, forming the hybrid (CB/SrAp). The synthesis third route consists of strontium insertion into the culture medium, which leads the formation of a hybrid CB/Sr by co-condensation. The three biomaterials produced were evaluated and compared, related to the amount of metal adsorbed and to the elution process. The higher amount of Sr adsorbed in the biomaterials for each route was in the following order: CB/SrAp > CB/CaHA/Sr > CB/Sr, 237,31; 29,91; 26,25 mg of Sr per g material, respectively. The CB/CaHA/Sr presented the lowest adsorbed amount and earlier Sr release, with around 80% of Sr desorbed after 26h. The equilibrium adsorption data were described using the Langmuir model. Some parameters were investigated (temperature and pH) in the adsorption process. The Sr release by the other two materials (CB/Sr and CB/SrAp) were around 50% and 16% of the total Sr amount after 26 h, respectively. During production of CB/Sr it was observed that when compared to a BC control sample (produced without the addition of strontium) in the culture medium, there was a yield loss in terms of cellulose mass, suggesting that Sr causes a decrease in production of CB, it is corroborated by the decrease in sugar consumption by the bacteria. The materials were characterized through FTIR, SEM, BET, TGA, determination of porosity and swelling degree in order to elucidate the morphology and the interaction metal/biopolimer. From these results we can concluded that biomaterials produced are able to adsorb/desorb Sr ions, showing a different profile for each material, involving either chemisorption and physisorption mechanisms.

Keywords: Bacterial Cellulose. Hydroxyapatite. Strontium. Hybrid materials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo de remodelação óssea.....	18
Figura 2 – Vantagens e desvantagens dos materiais clássicos utilizados para obtenção de híbridos	19
Figura 3 – Estrutura química da celulose bacteriana.....	20
Figura 4 – Estrutura química da hidroxiapatita - $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	21
Figura 5 – Estrutura química do Ranelato de estrôncio.....	23
Figura 6 – Interação do RANKL-RANK/ Complexo biomolecular OPG (Adaptado)	24
Figura 7 – Esquema da ação do estrôncio na osteoblastogênese	25
Figura 8 – Fluxograma da metodologia de obtenção dos biomateriais	31
Figura 9 – Ensaios realizados para os biomateriais CB/CaHA/Sr; CB/SrAp e CB/Sr	32
Figura 10 – Caracterizações realizadas com as matrizes CB e CB/CaHA e biomateriais produzidos	33
Figura 11 – Celulose bacteriana, em meio de cultivo HS, com seis dias de incubação	39
Figura 12 – Diferentes fases de produção do material híbrido celulose bacteriana (CB) e hidroxiapatita (CaHA).....	40
Figura 13 – Matriz CB/CaHA liofilizada e após fratura.....	40
Figura 14 – Biomateriais produzidos dopados com estrôncio.....	41
Figura 15 – Grau de intumescimento (%) das matrizes CB e CB/CaHA em solução de estrôncio (100 mg/L) e pH 6,0.....	42
Figura 16 – Grau de intumescimento das matrizes CB e CB/CaHA em água destilada à pH 7,1.....	43
Figura 17 – Grau de intumescimento dos biomateriais produzidos (CB/CaHA/Sr, CB/SrAp, CB/Sr) em água à pH 7,1.....	44
Figura 18 – Isoterma de adsorção de nitrogênio das matrizes CB (a) e CB/CaHA (b) à 77K.....	47
Figura 19 – Eletromicrografias da matriz celulose bacteriana (CB) (a) superfície e (b) corte transversal.....	48
Figura 20 – Eletromicrografias da matriz celulose bacteriana (CB) com hidroxiapatita (CaHA) (a) superfície e (b) corte transversal.....	49
Figura 21 – Eletromicrografias do biomaterial CB/CaHA/Sr (a) superfície (b) corte transversal.....	50

Figura 22 – Eletromicrografias do biomaterial CB/SrAp (a) superfície (b) corte transversal.....	51
Figura 23 – Eletromicrografias do biomaterial CB/Sr (a) superfície (b) corte transversal..	52
Figura 24 – Espectros vibracionais na região do infravermelho da CB e do híbrido CB/Sr.....	53
Figura 25 – Espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras híbridas CB/CaHA, CB/SrAp e CB/CaHA/Sr.....	54
Figura 26 – Análise termogravimétrica das amostras híbridas CB/CaHA/Sr, CB/SrAp, CB/Sr.....	56
Figura 27 – Cinética de adsorção de Sr ²⁺ pela matriz CB/CaHA em função do tempo, Co = 100 mg/L, pH = 6,0.....	58
Figura 28 – Efeito do pH na adsorção de Sr ²⁺ pelo híbrido CB/CaHA, Co = 100 mg/L, pH variando de 2,0 à 6,0.....	59
Figura 29 – Efeito da temperatura na adsorção de Sr ²⁺ por CB/CaHA, Co = 100 mg/L, Temperatura variando de 20 à 40°C.....	60
Figura 30 – Isotermas de adsorção com ajuste ao modelo de Langmuir em temperaturas de 25°C e 40°C.....	61
Figura 31 – Determinação de estrôncio a cada ciclo de imersão em concentrações de (a) 100 e (b) 1000 mg/L.....	62
Figura 32 – Quantificação de estrôncio aprisionado na CB após a fermentação (6 dias)....	65
Figura 33 – Dessorção de estrôncio dos biomateriais produzidos.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porosidade média das matrizes CB e CB/CaHA.....	45
Tabela 2 – Valores médios da porosidade dos materiais híbridos incorporados com Sr...	45
Tabela 3 – Propriedades texturais das matrizes CB e CB/CaHA obtidas através das isothermas de adsorção de nitrogênio.....	46
Tabela 4 – Atribuições prováveis das bandas de absorção das amostras híbridas sintetizadas	55
Tabela 5 – Parâmetros dos íons Sr obtidos pelo ajuste das isothermas à 25°C e 40°C	61
Tabela 6 – Valores de massa de CB e porcentagem de rendimento com e sem a inserção do estrôncio no meio de cultivo.....	63
Tabela 7 – Teores de açúcares redutores no meio de cultivo com e sem adição de Sr antes e após 6 dias de fermentação.....	64
Tabela 8 – Valores de adsorção de Sr para cada biomaterial produzido.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica
Ap	Apatita
BET	S. Brunauer, P. Emmet e E. Teller para cálculo da área superficial.
CB	Celulose Bacteriana
CB/CaHA/Sr	Celulose Bacteriana + Hidroxiapatita de Cálcio + Estrôncio
CB/SrAp	Celulose Bacteriana + Apatita de Estrôncio
CB/Sr	Celulose Bacteriana + Estrôncio
EXAFs	Espectroscopia de absorção de raios-X
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
HA	Hidroxiapatita
LANAGUA	Laboratório Núcleo de Águas
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Sr	Estrôncio
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	Biomateriais	17
2.2	Tecido ósseo.....	18
2.3	Materiais Híbridos	19
2.4	Interação Celulose Bacteriana (CB) e Hidroxiapatita (HA).	20
2.5	Estrôncio (Sr).....	22
2.6	Fundamentos de adsorção e dessorção	26
3	OBJETIVO GERAL.....	29
3.1	Objetivos Específicos.....	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	Microrganismo.....	30
4.2	Fluxograma da produção dos biomateriais.....	30
4.3	Produção do biomaterial celulose bacteriana e hidroxiapatita de cálcio com estrôncio (CB/CaHA/Sr).	31
4.4	Produção do biomaterial celulose bacteriana e apatita de estrôncio (CB/SrAp). 32	
4.5	Produção do biomaterial celulose bacteriana e estrôncio (CB/Sr).	32
4.6	Caracterizações das matrizes CB e CB/CaHA e dos biomateriais produzidos ..	33
4.6.1	<i>Grau de intumescimento</i>	33
4.6.2	<i>Determinação da porosidade</i>	34
4.6.3	<i>Isotermas de Adsorção de N₂ – BET</i>	34
4.6.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV</i>	34
4.6.5	<i>Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho - FTIR</i>	35
4.7	Análise termogravimétrica - TGA	35
4.8	Método analítico de quantificação de estrôncio.....	35
4.9	Análises realizadas com o híbrido CB/CaHA/Sr	35
4.9.1	<i>Cinética de Adsorção</i>	36
4.9.2	<i>Efeito do pH</i>	36
4.9.3	<i>Efeito da Temperatura</i>	36
4.9.4	<i>Isoterma de adsorção</i>	36

4.10	Análises realizadas com o híbrido CB/SrAp.....	37
4.10.1	<i>Quantificação de estrôncio a partir dos ciclos de imersão</i>	37
4.11	Análises realizadas com o híbrido CB/Sr	37
4.11.1	<i>Efeito do estrôncio na produção de CB</i>	37
4.11.2	<i>Teor de açúcar redutor</i>	37
4.11.3	<i>Quantificação de estrôncio incorporado na estrutura de celulose bacteriana</i>	38
4.12	Estudo de dessorção	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	Obtenção da CB.....	39
5.2	Produção dos materiais híbridos.	39
5.3	Caracterizações morfológicas das matrizes CB e CB/CaHA e dos biomateriais produzidos (CB/CaHA/Sr, CB/SrAp e CB/Sr).	41
5.3.1	<i>Grau de intumescimento</i>	41
5.3.2	<i>Determinação da porosidade</i>	44
5.3.3	<i>Isotermas de Adsorção de N₂ – BET</i>	45
5.3.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV</i>	47
5.3.4.1	<i>MEV das matrizes CB e CB/CaHA</i>	47
5.3.4.2	<i>MEV dos três biomateriais produzidos dopados com Sr.</i>	49
5.3.5	<i>Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho - FTIR</i>	52
5.3.6	<i>Análise Termogravimétrica- TGA</i>	55
5.4	Estudo de adsorção.....	56
5.4.1	<i>Análises realizadas para obtenção do biomaterial CB/CaHA/Sr</i>	56
5.4.1.1	<i>Cinética de Adsorção</i>	56
5.4.1.2	<i>Efeito do pH</i>	57
5.4.1.3	<i>Efeito da temperatura</i>	58
5.4.1.4	<i>Isoterma de adsorção</i>	59
5.4.2	<i>Análises realizadas com o biomaterial CB/SrAp</i>	60
5.4.2.1	<i>Adsorção de Sr nos ciclos de imersão</i>	60
5.4.3	<i>Análises realizadas com o híbrido CB/Sr</i>	61
5.4.3.1	<i>Influência de Sr na produção de CB</i>	61
5.4.3.2	<i>Teor de açúcar redutor</i>	62
5.4.3.3	<i>Estrôncio incorporado na estrutura de CB por co-condensação</i>	63
5.5	Estudo de dessorção	63
6	CONCLUSÃO	65

7	SUGESTÕES FUTURAS.....	65
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo humano é inervado que possui uma matriz formada pela associação de uma fase mineral e outra orgânica (REZNIKOV *et al.*, 2014). A matriz orgânica é formada de colágeno, predominantemente, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas e a inorgânica é constituída por íons de fosfato, cálcio e em baixas quantidades de magnésio, potássio, sódio. A junção entre fosfato e cálcio dá a formação de cristais de hidroxiapatita que se associam às fibras de colágenos (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

Na fase adulta os ossos passam por uma constante renovação do tecido, o tecido velho é removido e forma-se um novo tecido no local, em um processo conhecido como remodelação. A remodelação óssea é constituída pelos mecanismos de formação e reabsorção óssea. Esses mecanismos são responsáveis pela qualidade na densidade mineral óssea. Se houver uma desproporção no organismo, por exemplo havendo mais reabsorção do que formação, o indivíduo pode desenvolver osteoporose. Nesses casos há uma perda excessiva de minerais presentes no osso, podendo se agravar com a diminuição dos hormônios sexuais, como no caso das mulheres na pós-menopausa (RYAN, 2004).

Os biomateriais vêm servindo como base de vários estudos na tentativa de encontrar combinações que levem a um biomaterial com características compatíveis e que mais se assemelhem aos tecidos humanos e que também proporcionem uma baixa resposta inflamatória ao indivíduo (ORÉFICE, PEREIRA, MANSUR, 2006). O intuito da maioria desses estudos é deixá-los o mais parecido possível com o tecido humano e ainda serem capazes de interagir com células (SAKIYAMA-ELBERT, HUBBELL, 2001).

A produção de biomateriais com duas fases distintas (orgânica e inorgânica) que dá origem aos materiais híbridos estão atualmente sendo bastante explorados, pois constituem alternativas de materiais multifuncionais que apresentam propriedades complementares. Combinam as vantagens dos polímeros orgânicos, que são de fácil processamento, baixa densidade e alta flexibilidade com a dos materiais inorgânicos que apresentam alta resistência mecânica, boa resistência química e estabilidade térmica (KARATAS *et al.*, 2009)

Os materiais híbridos obtidos da interação de celulose bacteriana com hidroxiapatita tem mostrado serem materiais promissores para a utilização em engenharia de tecidos, pois a celulose bacteriana (CB) é um biopolímero de excelentes propriedades mecânicas, comparado a celulose vegetal, de alta cristalinidade e de elevada capacidade de retenção de água (RAJWADE *et al.*, 2015; AHN, SUNG-JUN, *et al.*, 2015). Sua combinação com a hidroxiapatita (HA) promoverá vários benefícios para o tecido ósseo, uma vez que a HA

é uma cerâmica bastante explorada em pesquisas para reparação óssea por ser um constituinte natural dos ossos e dos dentes, apresentando elevada biocompatibilidade, estabilidade em pH fisiológico e estimula interações ósseas (PIGOSSI *et al.*, 2015).

Esses compósitos produzidos a partir de CB e HA são materiais com potencial para aplicação na engenharia de tecidos ósseos, dado que a interação desses dois tipos de materiais favorece a reparação óssea por apresentar características como elevadas propriedades mecânica, biocompatibilidade e biodegradabilidade ajustável (DUARTE *et al.*, 2015).

Com o intuito de potencializar os benefícios que a interação CB e HA apresenta para os mecanismos de remodelação óssea é sugerido a introdução de estrôncio (Sr) a esse material híbrido. Esse metal tem despertado interesse em razão de apresentar uma relação direta com a qualidade dos ossos. Estudos pré-clínicos demonstram os mecanismos de ação do estrôncio sobre a modelação óssea e comprovam sua atuação como inibidor da reabsorção óssea, reduzindo a atividade dos osteoclastos (CAUDRILLIER *et al.*, 2010). Também atuam como indutor na formação óssea, estimulando a atividade dos osteoblastos (MARIE *et al.*, 2011). Sua dupla ação vem despertando grande interesse devido a sua semelhança química com o cálcio e o que levou ao surgimento do ranelato de estrôncio que é um fármaco bastante utilizado no tratamento da osteoporose (QUERIDO *et al.*, 2016).

Portanto, neste trabalho foram produzidos biomateriais funcionalizados com estrôncio em matrizes de celulose bacteriana/hidroxiapatita para avaliar a adsorção e dessorção desse metal, de modo a potencializar a interação CB e HA, no benefício do tecido ósseo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biomateriais

Segundo Helmus e Tweden (1995) o termo biomaterial é definido como qualquer substância ou combinação de substâncias, sintética ou natural em origem, que possa ser utilizada por um tempo determinado, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo.

Os biomateriais são classificados de acordo com sua composição química e/ou quanto à resposta do tecido hospedeiro, neste caso podem ser: bioinertes, bioativos, biotolerados e reabsorvíveis. Os bioinertes são materiais menos suscetíveis e não causam resposta inflamatória ao indivíduo, devido sua estabilidade química; os bioativos são capazes de interagir com as células do corpo, participando de reações biológicas específicas, devido à presença de íons; os biotolerados são parcialmente aceitos pelo tecido receptor e geralmente apresentam tecido fibroso; os reabsorvíveis são materiais degradáveis que são gradualmente substituídos pelos tecidos. Quanto à composição química, existem as classes dos cerâmicos, poliméricos, metálicos, compósitos e semicondutores (SHACKELFORD, 2008).

Os biomateriais devem apresentar alguns requisitos essenciais para ter um bom desempenho em aplicações biomédicas, tais como: permitir sua vascularização e ser biocompatível (SERVICE, 2000).

Na engenharia de tecidos, é necessário atentar para fatores críticos na recuperação de órgãos ou tecidos. O principal fator que deve ser observado é o suporte, ou seja, o biomaterial que está sendo utilizado, analisando sua contribuição no crescimento de células e elementos que podem influenciar a atividade celular (VOLKMER; SANTOS, 2007).

Outro fator para o uso intenso dos biomateriais é a possibilidade de serem utilizados como sistemas para entrega de fármacos (HOLZAPFEL *et al.*, 2013). Porém, o principal impasse relatado nas pesquisas é a possibilidade de formação de trombos, uma resposta inflamatória do organismo, das quais, muitas vezes desencadeada pelas associações de biomateriais (GORBET, SEFTON, 2004).

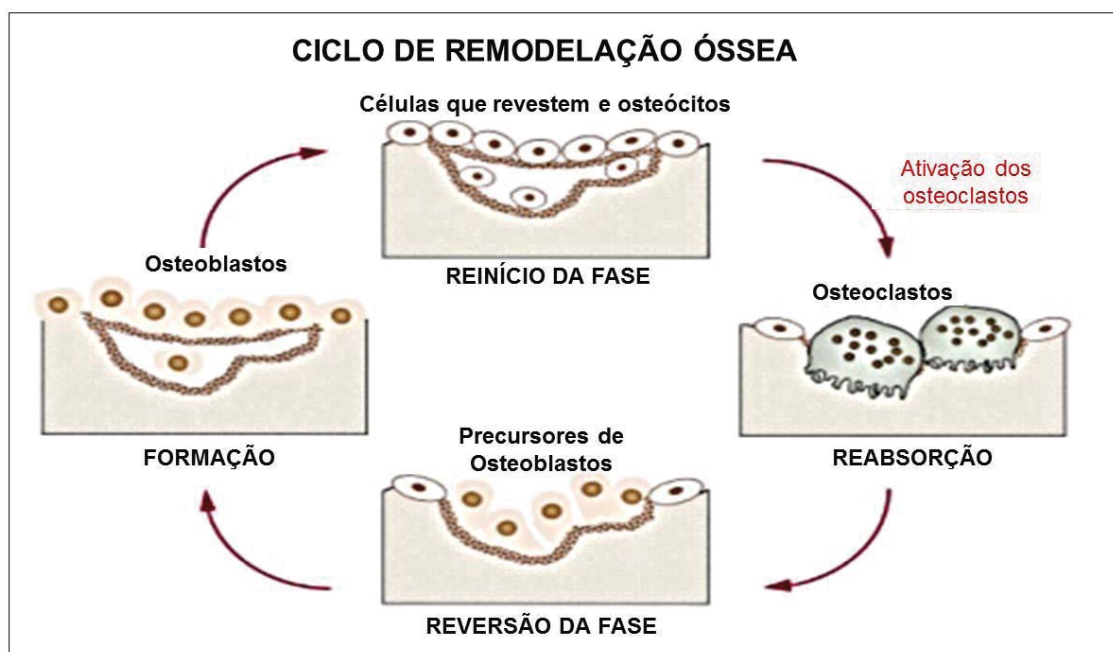
O desenvolvimento dos biomateriais para liberação de fármacos está sendo bastante explorado, principalmente, na área odontológica. Isso tem provocado um aumento dos adeptos de implantes, devido às descobertas recentes, de materiais capazes de realizar restaurações nos tecidos ósseos (BUGARIN, GARRAFA, 2007).

2.2 Tecido ósseo

Segundo Garg (2004), o tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado em constante processo de reabsorção e neoformação. Suas principais funções no organismo são as de suporte estrutural e reservatório de cálcio. Em torno de 99% dos minerais que o corpo humano contém são encontrados no tecido ósseo.

O tecido ósseo é formado durante o crescimento e é mantido durante a vida adulta pela renovação contínua da matriz, processo conhecido como remodelação óssea, conforme ilustrado na Figura 1. Essa remodelação é assegurada por dois tipos de células – osteoclastos: células responsáveis pela destruição e reabsorção óssea; osteoblastos: células responsáveis pela formação óssea; osteócito: é o osteoblasto maduro responsável pela manutenção óssea (ANDIA, CERRI, SPOLIDORIO, 2006).

Figura 1 – Processo de remodelação óssea.



Fonte: HILL e ORTH (1998).

O tecido ósseo possui um elevado potencial de recuperação e reparação do tecido danificado. Por ser bastante vascularizado e innervado, ele proporciona a renovação das células intensificando a reparação e aumentando a neoformação óssea (GEIGER *et al.*, 2003). Porém, quando o trauma no tecido é de grande porte, esse potencial pode ser afetado e desencadear deformações ósseas irreversíveis. Essa limitação que o tecido ósseo apresenta é uma das maiores causas que estimulam as pesquisas na área médica e odontológica.

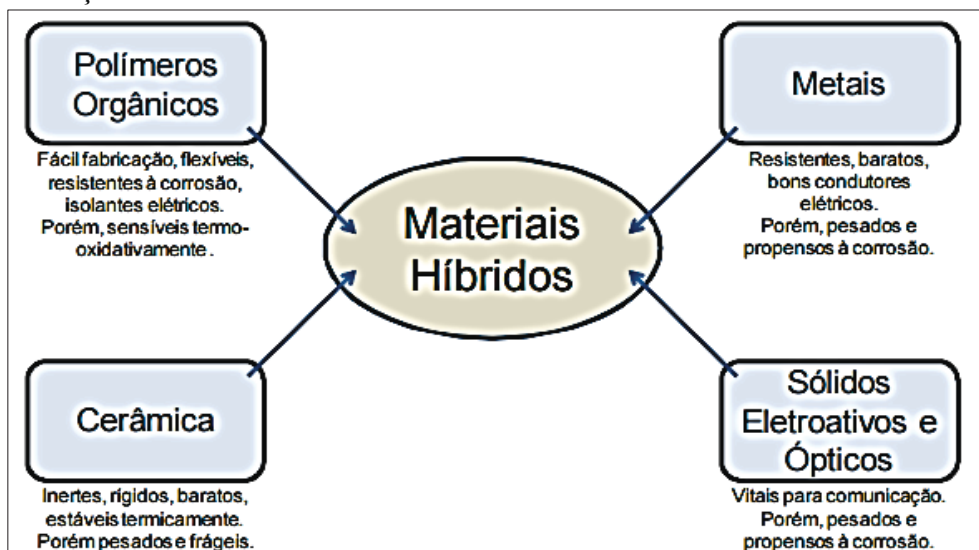
Estudos estão sendo desenvolvidos para investigar materiais que sejam eficientes em reparar e substituir o tecido danificado, iniciando um processo natural de regeneração. A natureza biológica do osso consiste numa mistura de nanocompósitos orgânicos e inorgânicos, sendo 70% inorgânico, principalmente, de hidroxiapatita e 30% orgânico, predominantemente, de colágeno tipo I. Sua conformação apresenta nanocristais de hidroxiapatita em forma de placa alinhados às nanofibras do colágeno (ZANG *et al.*, 2010).

2.3 Materiais Híbridos

O conceito de material híbrido é definido pela combinação de duas fases distintas sendo constituída de materiais orgânicos e inorgânicos dando origem a um novo material com propriedades melhoradas em relação aos materiais de origem, pois há uma complementação das propriedades dos materiais iniciais (SAEGUSA, 1995). Os componentes formadores dos híbridos interagem sinergicamente aproveitando suas propriedades da melhor forma possível (SANCHEZ *et al.*, 2005).

A ciência tem buscado produzir materiais que possam ser aplicados, principalmente, nas áreas biomédicas e isso tem desencadeado pesquisas no desenvolvimento de materiais híbridos, devido sua diversidade de combinações. Porém, a escolha dos materiais de origem deve estar atrelada à possível aplicação, pois ainda há limitações nos usos desses híbridos. A união de dois materiais caracteriza na junção das propriedades favoráveis, contudo, resta ainda eliminar as propriedades indesejáveis (GOMEZ-ROMERO, 2001). As vantagens e desvantagens de alguns materiais são destacados na Figura 2.

Figura 2 – Vantagens e desvantagens dos materiais clássicos utilizados para obtenção de híbridos.



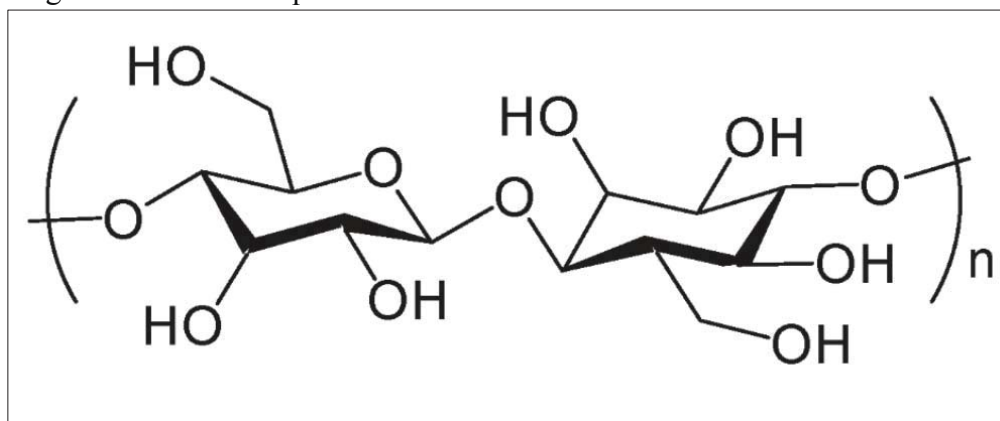
Fonte: SILVÉRIO (2009).

O principal objetivo no estudo dos materiais híbridos está na busca de novas metodologias de síntese e nas diversas combinações de materiais, determinando suas possíveis aplicações (GUIZARD, BARBOIU, HOVNANIAN, 2001).

2.4 Interação Celulose Bacteriana (CB) e Hidroxiapatita (HA).

A celulose bacteriana é sintetizada através de um processo fermentativo por bactérias do gênero *Gluconacetobacter* a produtora mais eficiente. Bactérias desse gênero são Gram-negativas, não patogênicas, estritamente aeróbias e convertem glicose, glicerol e outros substratos em celulose. Podem ser encontradas em bebidas alcoólicas, vinagre e em frutas (STEINBÜCHEL, DOI, 2005). É um polímero linear de glicose (FIGURA 3) que possui nanoestrutura fibrilar única que gera suas propriedades superiores à da celulose vegetal, sendo características promissoras para aplicações biomédicas (CZAJA *et al.*, 2007).

Figura 3 – Estrutura química da celulose bacteriana.



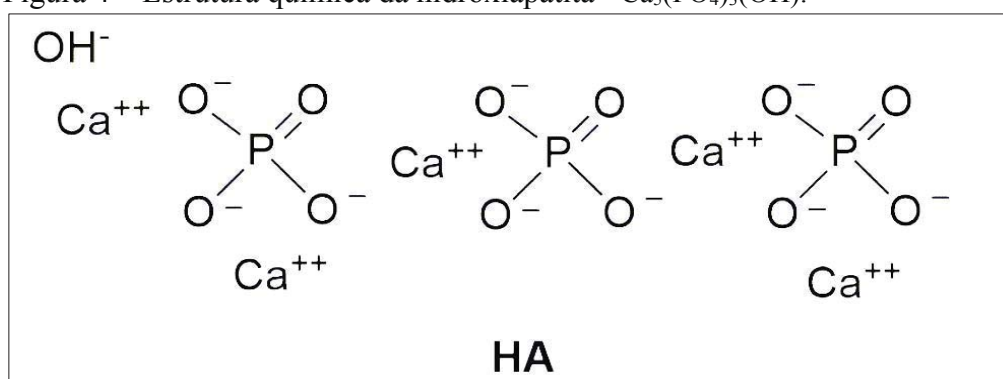
Fonte: SHI *et al.* (2012).

A CB é produzida a partir de meios de cultivos que apresentam fontes de carbono. A bactéria do gênero *Gluconacetobacter* convertem a glicose em celulose, sendo assim, seu metabólito. A glicose utilizada pela bactéria produtora da CB é utilizada como fonte de energia como molécula precursora do biopolímero. Sendo mais pura e altamente cristalina que a celulose vegetal, ela não associada à lignina, hemicelulose e como geralmente ocorre com a celulose vegetal. Estruturalmente apresenta fibrilas muito finas, sendo considerado um material altamente poroso e que possibilita a transferências de fármacos, além disso, atua como barreira física, e há muitos anos vem sendo utilizada como curativos na cicatrização de feridas (CZAJA *et al.*, 2006; ROSS, MAYE, BENZIMAN, 1991; TAKAHASHI *et al.* 2003; UHLIN, ATALLA, THOMPSON, 1995).

A celulose bacteriana vem sendo utilizada em diversas aplicações como: pele artificial, vasos sanguíneos artificiais, córneas artificiais, próteses cardíacas, uretra artificial, osso artificial, cartilagem artificial entre outros (HALIB, *et al.*, 2009).

A importância biológica da hidroxiapatita está relacionada à ação de facilitar a multiplicação dos fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas. Sua compatibilidade com os tecidos ósseos é devido a sua semelhança química superficial com o próprio osso e capacidade de permutar os íons com o meio fisiológico tendendo ao equilíbrio implante-osso (NEJATI; MIRZADEH; ZANDI, 2008). Sua semelhança com o tecido ósseo faz com que os fosfatos de cálcio sejam bastante explorados. A matriz mineral óssea possui cristais à base de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (SATO, WEBSTER, 2004). Também podendo apresentar fórmula química $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ (FIGURA 4). A composição química da hidroxiapatita biológica varia ao longo da vida (KOKUBO *et al.*, 2003), podendo ser formada por outros íons, como o carbonato ou até mesmo ocorrer o agrupamento de outros elementos como estrôncio, silício, magnésio, flúor, entre outros.

Figura 4 – Estrutura química da hidroxiapatita - $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$.



Fonte: IANNAZZO *et al.*, (2015).

Os híbridos obtidos da união de celulose bacteriana com hidroxiapatita tem mostrado ser um material promissor para a utilização em engenharia de tecidos, pois a celulose bacteriana (CB) é um biopolímero de excelentes propriedades mecânicas, comparado a celulose vegetal, de alta cristalinidade e de elevada capacidade de retenção de água, ela também é obtida livre de lignina e de hemicelulose, por isso, é considerado um material de alta pureza. Essas propriedades abrem um amplo espectro para sua aplicação, em especial no campo dos biomateriais (RAJWADE *et al.*, 2015; AHN, SUNG-JUN, *et al.*, 2015). Sua combinação com a hidroxiapatita (HA) tem proporcionado vários benefícios para o tecido ósseo, uma vez que a HA é um constituinte natural dos ossos e dos dentes, apresentando elevada biocompatibilidade, estabilidade em pH fisiológico e estimula interações ósseas (PIGOSSI *et al.*, 2015).

A interação desses dois tipos de materiais (CB e HA) resulta em um compósito híbrido com elevadas propriedades mecânica, biocompatibilidade e biodegradabilidade ajustável (DUARTE *et al.*, 2015).

Grande *et al.*, (2009) produziram membranas porosas contendo nanopartículas de hidroxiapatita e carboximetilcelulose (CMC), com o intuito de proporcionar estabilização do nanocompósito, com poros maiores e maior cristalinidade. Cerca de 0,25% de CMC foi incorporado nos nanocompósitos produzidos. Pelo DRX foi visto que a cristalinidade ficou menor do que a hidroxiapatita pura, indicando uma estabilidade química, sendo favorável para aplicações biomédicas. Essas modificações proporcionaram numa viabilidade celular e biocompatibilidade do material na utilização com células do rim humano.

Zimmermann *et al.*, (2011), trabalharam com membranas de CB e hidroxiapatita mostrando que o aumento do tamanho dos cristais de hidroxiapatita foram favorecidos pela densidade das fibras de CB, deixando-as mais porosas, essa porosidade, por sua vez, é bem vista para engenharia de tecidos que beneficia a migração e multiplicação celular tornando a regeneração de tecidos ósseos possíveis, e que os “scaffolds” produzidos propiciam a interação com células osteoprogenitoras sobre a superfície do material.

Duarte *et al.*, (2015), elaboraram biocompósitos à base de celulose bacteriana (CB), produzida em resíduos agroindustriais (suco de caju, líquido de sisal) sem a necessidade de suplementação combinado com a hidroxiapatita (HA), onde a hidroxiapatita sintetizada é uma apatita deficiente de cálcio, porém, semelhante a biológica. Realizaram testes em fluido corpóreo simulado confirmando que o material produzido apresenta bioatividade, sendo um material promissor para o uso na regeneração do tecido ósseo.

Recouvreux (2008), preparou membranas porosas de celulose bacteriana e adicionados no meio de cultivo acemana, um polissacarídeo provindo da planta *Aloe barbadensis* com hidroxiapatita para formação de um composto de multicamadas. Após a formação de poros as propriedades físico-químicas da CB foram alteradas. A adição de acemana nas fibras de celulose favoreceu a deposição de hidroxiapatita na superfície, tornando o material aplicável em regenerações ósseas.

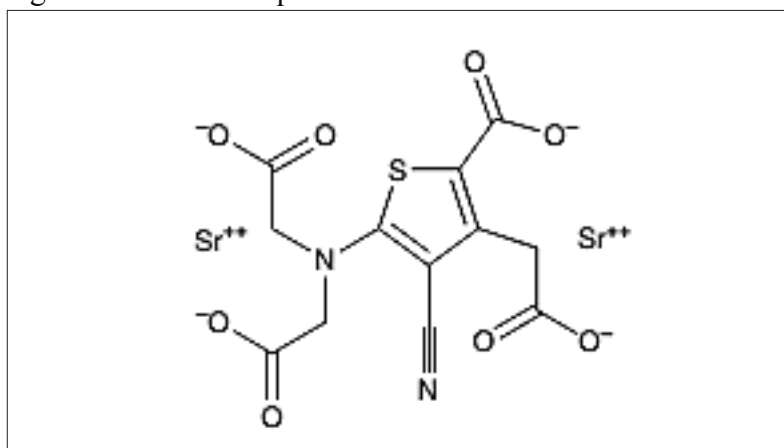
2.5 Estrôncio (Sr)

O estrôncio é um metal pertencente à família dos alcalinos terrosos e pela sua semelhança com o cálcio, há relatos que esse metal pode atuar estimulando a formação óssea, reduzindo a reabsorção óssea (REGINSTER, 2002). Sua combinação com biomateriais pode resultar num aumento da bioatividade e biocompatibilidade para o tratamento da osteoporose

(BLAKE; FOGELMAN, 2006). Na natureza ele não é encontrado livre, apresentando-se como cátions divalentes e hidrofílico, com baixa ligação protéica e baixo volume de distribuição (LIMITED, 2011).

Ranelato de estrôncio é um fármaco sintético com denominação química 5-(bis[carboximetil]amino)-2-carboxi-4-ciano-3-tiofenacético (FIGURA 5), indicado para no tratamento de mulheres acometidas por osteoporose pós-menopausa. Esse medicamento apresenta dois átomos estáveis de estrôncio (Sr^{2+}) ligados ionicamente ao ácido ranélico em seu composto e que ativa vias de sinalização das células ósseas para produção de efeitos positivos sobre a qualidade, resistência da massa óssea e reduzindo o risco de fraturas. O estrôncio é a parte inorgânica farmacologicamente ativa da molécula (DEEKS, DHILLON, 2010).

Figura 5 – Estrutura química do Ranelato de estrôncio.



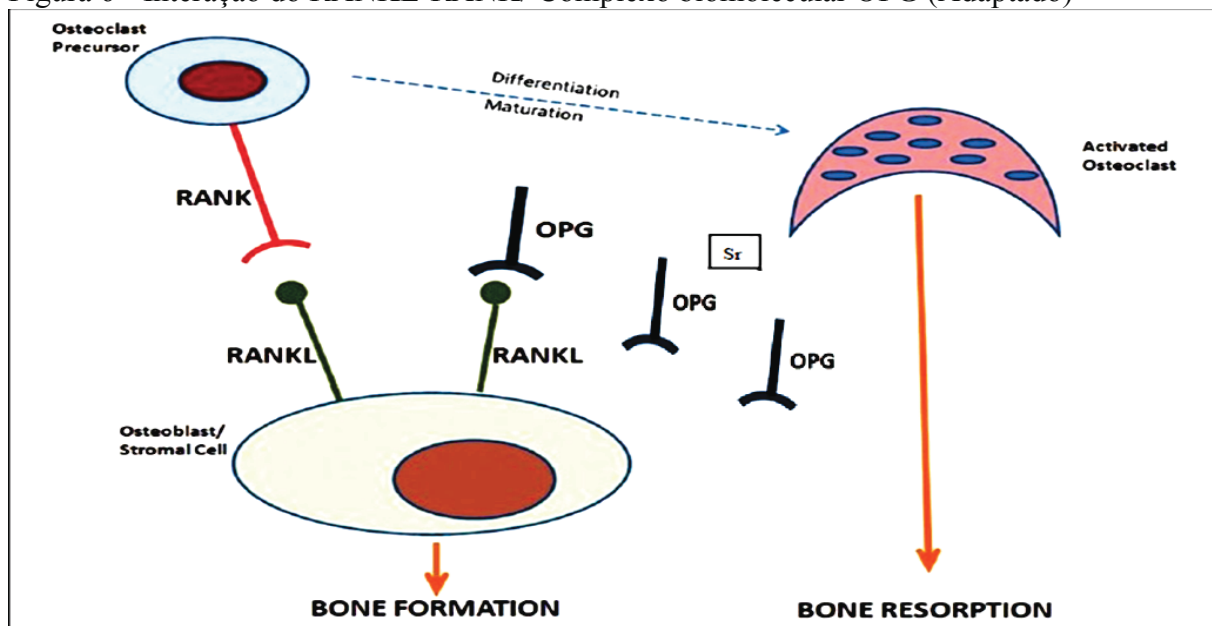
Fonte: DEEKS e DHILLON (2010).

O uso do ranelato de estrôncio no tratamento de osteoporose está legalizado em países da Europa (YANG, 2011). Já no Brasil ele é comercializado como Protos em sachês contendo um pó granulado de colocação amarela, desde de 26 de dezembro 2005. Porém, foram detectados efeitos adversos no tratamento sistêmico, principalmente naqueles indivíduos com risco para tromboembolismo venoso (RIZZOLI, REGINSTER, 2011).

A entrega local, quando viável, pode ser uma alternativa para administração oral que, em alguns casos, libera doses adequadas do agente, projetando uma liberação localizada no tecido alvo, reduzindo sua toxicidade, impedindo causar danos à tecidos saudáveis (ALBERTSSON; VARMA, 2003).

O mecanismo de ação do estrôncio está relacionado à regulação da osteoclastogênese e à diferenciação dos osteoclastos (FIGURA 6).

Figura 6 - Interação do RANKL-RANK/ Complexo biomolecular OPG (Adaptado)



Fonte: KOHLI; KOHLI, (2011).

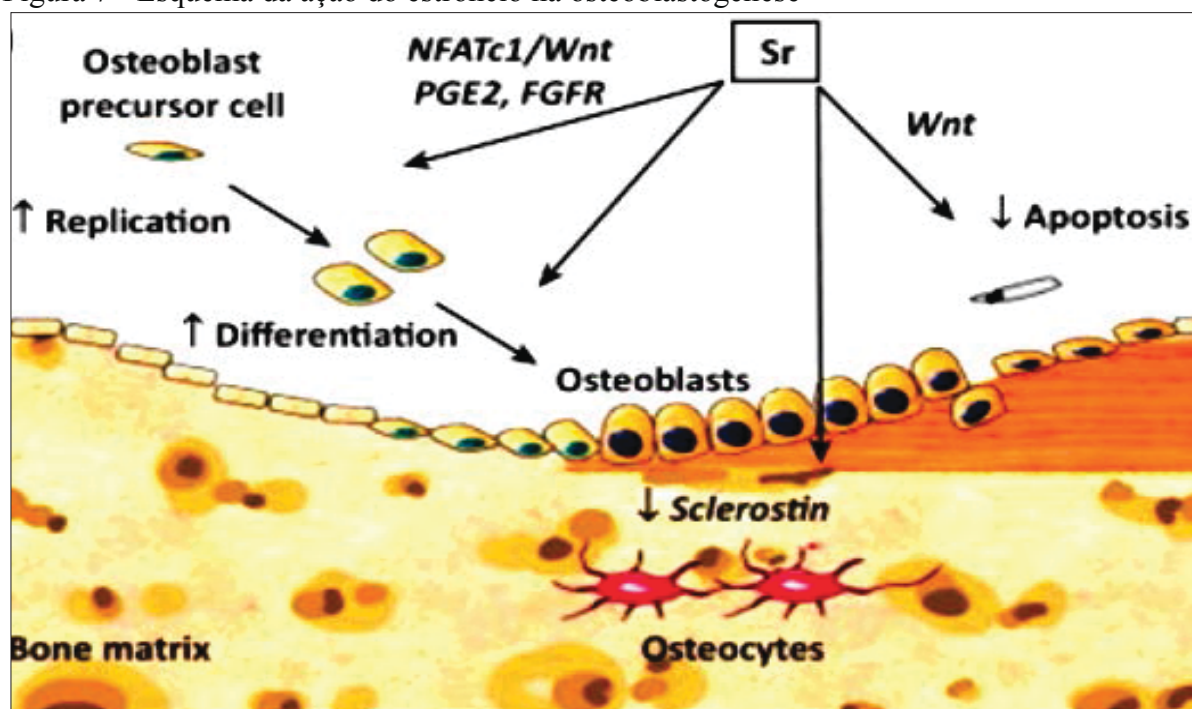
As principais proteínas desta via são o Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B (RANK), seu ligante (RANKL) e o competidor natural do RANKL, denominado Osteoprotegerina (OPG). A via denominada RANK/RANKL/OPG é responsável por desempenhar um papel fundamental na sinalização da osteoclastogênese e na remodelação óssea (TAKAHASHI *et al.*, 2003).

A reabsorção óssea ocorre pela interação de proteínas ligantes, presente na membrana citoplasmática de osteoblastos com receptores na membrana dos pré-osteoclastos. RANK é responsável pela diferenciação e ativação osteoclastos (os pré-osteoclastos expressam o receptor RANK). Os osteoblastos expressam o ligante RANKL em sua membrana. RANKL se liga ao RANK ativando a sinalização intracelular que resulta na diferenciação dos osteoclastos. No entanto, os osteoblastos também liberam a proteína OPG. Quando o OPG se liga no RANKL ele vai inibir a osteoclastogênese (FIGURA 6). Dentre os mecanismos de ação do Sr^{2+} é estimular a produção de OPG (TAKAHASHI *et al.*, 2003). A ação do ranelato de estrôncio sobre osteoclastos também está relacionado a via dos receptores sensíveis ao cálcio extracelular (CaRS).

Os receptores sensíveis ao cálcio estão presentes nos osteoclastos, osteoblastos e osteócitos pois são responsáveis pela manutenção do cálcio extracelular. Nos osteoblastos, os íons Sr^{2+} ativam a via os receptores CaRS que induzem a expressão das proteínas quinases que atuam na replicação e proliferação de osteoblastos e induz a apoptose dos osteoclastos, assim reduzindo a atividade dos osteoclastos e inibindo a reabsorção óssea (MARIE *et al.*, 2011). E

por fim com ativação da via Cn/ NFATc/Wnt (Cn: Calcineurina, NFATc: Fator Nuclear de Células T ativadas, Wnt: regulador Wnt) completa-se a osteoblastogênese (FROMIGUE *et al.*, 2010). Os principais mecanismos da ação dos receptores sensíveis ao cálcio estão descritos na Figura 7.

Figura 7 - Esquema da ação do estrôncio na osteoblastogênese



Fonte: BOSE *et al.*, (2013).

Estudos recentes têm sugerido que o ranelato de estrôncio tem atacado mais rapidamente e mais eficiente na formação do osso cortical e trabecular indicando maior eficiência na prevenção de fraturas do que um outro fármaco bastante utilizado chamado alendronato que se enquadra na classe dos bisfosfonatos (RIZZOLI *et al.*, 2009).

De acordo com os dados da literatura, é demonstrado uma ação dessa classe de fármacos bisfosfonatos na estimulação da osseointegração através da inibição da reabsorção óssea. No entanto, outros estudos apontaram seus possíveis efeitos adversos. Sua excelente ação anti-reabsortiva tem inibido também o processo fisiológico de renovação e remodelação óssea dificultando ou até mesmo impedindo o reparo ósseo após traumas (SCULLY; MADRID; BAGAN, 2006).

A vantagem do ranelato de estrôncio sobre os fármacos exclusivamente anti-reabsortivos, como o caso do Alendronato, está na indução óssea e estimulação da atividade osteoblástica porque atua tanto na melhoria da densidade mineral óssea como na

qualidade da micro-arquitetura óssea e da quantidade de tecido neoformado (GIROTRA; RUBIN; BILEZIKIAN, 2006).

Na administração oral, o ranelato de estrôncio se dissocia em ácido ranélico e íons estrôncio (Sr^{2+}) e por possuir elevada afinidade com o tecido ósseo ele é incorporado à superfície da hidroxiapatita óssea por adsorção ou substituição iônica do cálcio presente no tecido ósseo. (MARIE *et al.*, 2001). Sendo assim, é interessante avaliar os biomateriais quanto a forma de adsorção e dessorção do metal estrôncio.

2.6 Fundamentos de adsorção e dessorção

Adsorção é um fenômeno de superfície que envolve ou não reações químicas. Esse fenômeno está relacionado a transferência de massa, a qual um fluido podendo ser gás, vapor ou líquido tende a se concentrar na superfície de um material. Esse fenômeno tem tempo finito de contato como sólido (RUTHVEN, 1984). A remoção de metais pode ocorrer de três maneiras: por adsorção física no qual a retenção das partículas acontece na superfície do adsorvente, por interações fracas; adsorção química quando é formado ligações fortes entre o adsorvente e o adsorbato; e por troca iônica onde o adsorvente permuta os íons existentes por íons do fluido (TENÓRIO; ESPINOSA, 2001).

Nascimento *et al.* (2014), explicam a adsorção como um mecanismo realizado por etapas. A primeira etapa é a difusão através do filme líquido, que está associada com aumento da concentração o adsorbato e pela agitação, pois esses dois fatores aumentam a difusão do adsorbato para a superfície do material. A segunda etapa ocorre uma difusão intra-poro que está relacionada com o tamanho da partícula e da distribuição do tamanho dos poros, pois nesse caso a difusão depende do tamanho relativo da molécula do adsorbato em relação ao tamanho do poro. A última etapa é a ocorrência da adsorção dentro do poro.

A isoterma de adsorção é uma ferramenta de medição da quantidade de adsorbato adsorvido pelo adsorvente. Isso se dá pelo contato de uma série de soluções com concentrações iniciais, distintas e conhecidas, em um determinado volume com uma massa de adsorvente à temperatura constante até o equilíbrio (VEGLIO; ESPOSITO; REVERBERI, 2003).

Em termos matemáticos, deve-se realizar um balanço de massa para determinar a quantidade de adsorbato removido da solução, conforme a Equação 1:

$$q = \frac{(C_o - C_e) V_L}{m_{\text{ads}}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde q é a capacidade de adsorção (mg do soluto/g do adsorvente); C_0 é a concentração inicial (mg/L); C_e é a concentração do adsorbato no equilíbrio (mg/L); V_L é o volume da solução (L); m_{ads} massa do adsorvente (g).

No processo de adsorção, o adsorbato em solução diminui com o decorrer do tempo até chegar a uma fase estacionária sem que haja mais a remoção dele na solução, atingindo o que chamamos de tempo de equilíbrio que é quando a quantidade que está sendo adsorvida está em equilíbrio dinâmico com a quantidade que está desorvendo (MONTEIRO, 2009).

O equilíbrio de adsorção é um dado imprescindível para compreensão dos processos, pois contribui para determinação da quantidade adsorvida na superfície do adsorvente. A partir da isoterma de adsorção pode-se obter mais informações, como estipular a capacidade máxima de adsorção (DO, 1998).

Vários parâmetros podem influenciar no processo de adsorção, tais como: pH, temperatura e o tipo de material adsorvente. A forma da isoterma vai fornecer dados que contribuem para a escolha do melhor modelo matemático a ser aplicado (aquele que melhor descreve os dados experimentais). Os modelos mais utilizados, segundo os dados da literatura, são o de Langmuir e de Freundlich (PEREIRA, SILVA, 2009). Modelos matemáticos são utilizados para descrever as isotermas de equilíbrio de adsorção. Vários modelos existentes são utilizados, porém, um dos mais aplicados é o modelo de Langmuir.

O modelo de Langmuir (EQUAÇÃO 2), baseia-se na dinâmica das moléculas adsorvidas que vão sendo distribuídas uniformemente para a formação de uma monocamada que recobre toda a superfície. A adsorção é um fenômeno que ocorre nos sítios ativos presente na superfície do material, quando há o preenchimento de todos esses sítios pode-se sugerir que corresponde a quantidade máxima de adsorção (ATKINS, DE PAULA 2006; CASTELLAN, 1986).

$$q = \frac{q_{\max} K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde q é a quantidade do soluto adsorvido (mg/g); q_{\max} é a capacidade máxima de adsorção (mg/g); K_L é a constante de interação adsorbato/adsorvente (L/mg); C_e é a concentração do adsorbato no equilíbrio (mg/L).

Os principais mecanismos que envolvem o fenômeno de adsorção-dessorção: 1) a quimissorção que é altamente específica e constrói ligações químicas com os sítios ativos da

superfície do adsorvente, que geralmente são seguidas de um alto calor de adsorção, acima de 20Kcal/mol. Esse tipo de adsorção é comumente irreversível, podendo ser percebida no processo de dessorção onde a substância adsorvida sofre mudanças na sua estrutura; no caso 2) a fissorção onde ocorre uma adsorção rápida e reversível através de ligações intermoleculares fracas entre o adsorvente e o adsorbato (CAVALCANTE JR, 1998).

Dessorção é um fenômeno que pode ser descrito como a liberação do adsorbato da interface do adsorvente. Ocorrendo quando o estado de equilíbrio dinâmico é alterado. Podendo serem desprendidos facilmente, caso o adsorbato tenha se ligado por forças de atração, como forças de Vander Walls, ou com maior dificuldade quando há ligações químicas forte envolvidas. A porcentagem dessorvida pode ser calculada de acordo com a Equação 3.

$$D(\%) = \frac{q_{des}}{q_{ads}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.})$$

Onde **D** é a porcentagem dessorvida (%); **q_{des}** é a quantidade do soluto dessorvida (mg/g); **q_{ads}** é a quantidade de soluto adsorvida (mg/g).

3 OBJETIVO GERAL

Produzir biomateriais funcionalizados com estrôncio em matrizes de celulose bacteriana e/ou hidroxiapatita para avaliar a incorporação e liberação de Sr, de modo a potencializar a interação CB e HA, visando aplicações na regeneração óssea.

3.1 Objetivos Específicos

- Obter biomateriais a partir de celulose bacteriana combinados ou não com hidroxiapatita;
- Funcionalizar biomateriais com estrôncio através de 3 diferentes rotas;
- Caracterizar as matrizes CB e CB/CaHA através de MEV, BET, FTIR, determinação de porosidade e grau de intumescimento;
- Avaliar a influência dos parâmetros, temperatura, massa e pH, na adsorção de Sr para o híbrido CB/CaHA/Sr (rota 1);
- Quantificar a incorporação de estrôncio no híbrido CB/SrAp (rota 2);
- Avaliar a influência do estrôncio na produção do híbrido CB/Sr (rota 3);
- Avaliar a capacidade de liberação do estrôncio pelos biomateriais produzidos, por meio de ensaios de dessorção.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

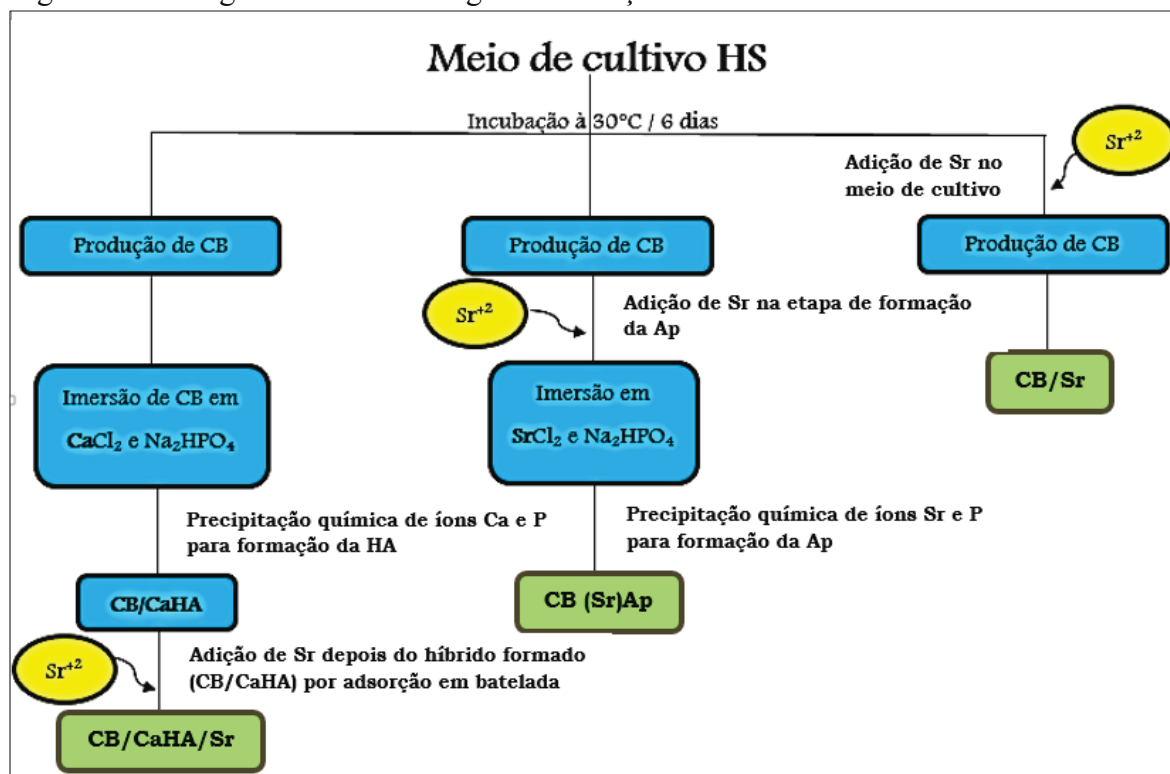
4.1 Microrganismo

A produção de celulose bacteriana (CB) foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da EMBRAPA Agroindústria Tropical. Foram utilizadas cepas *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 adquiridas da Coleção de Culturas da Fundação André Tosello (Campinas, Brasil). O cultivo dessa bactéria foi feito em meio líquido HS (HESTRIN; SCHRAMM, 1954) com pH 5,8 e incubados à 30°C durante seis dias. Na etapa de estocagem da cepa foram retiradas alíquotas de 0,1 mL da cepa cultivada em caldo HS e estriadas em placas contendo ágar HS e incubadas à 30°C/48h. A partir da cultura da placa foi removida uma suspensão espessa de células adicionado em caldo HS e misturado a glicerol 80% em tubos de eppendorf e armazenados à -20°C e -80°C. O inóculo foi preparado a partir da cultura em ágar HS inclinado estocada sob refrigeração (4-5°C).

4.2 Fluxograma da produção dos biomateriais

Os biomateriais foram produzidos por três rotas de síntese, a primeira rota consiste na formação de CB e hidroxiapatita formada, predominantemente, por fosfatos de cálcio (CB/CaHA) com a inserção de íons Sr por um sistema em batelada, ocasionando a adsorção do metal à superfície do material (CB/CaHA/Sr). Na segunda rota de síntese o híbrido é composto de CB e apatita de estrôncio, formada por fosfatos de estrôncio (CB/SrAp), através de ciclos de imersão da CB em solução de fosfato de sódio dibásico e solução de cloreto de estrôncio. A terceira rota de síntese consiste na adição de estrôncio ao meio de cultivo bacteriano, havendo a inclusão do metal em sua estrutura por co-condensação (CB/Sr). As etapas de obtenção dos biomateriais podem ser observadas na Figura 8.

Figura 8 - Fluxograma da metodologia de obtenção dos biomateriais



Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Produção do biomaterial celulose bacteriana e hidroxiapatita de cálcio com estrôncio (CB/CaHA/Sr).

A CB foi sintetizada por um processo fermentativo em 20 mL de caldo HS adicionado de 5% de inóculo (v/v) de *G. hansenii*. A fermentação foi conduzida 30°C/6 dias. Após esse período, o meio de cultivo foi removido e a película de CB foi esterilizada a 121°C/30 min. Em seguida, a película foi purificada, segundo metodologia descrita por Pineda, Mesa e Habert (2010). A película purificada foi armazenada em água pura (sistema Mili-Q) sob refrigeração. O material híbrido foi obtido utilizando-se o método proposto por Hutches *et al.*, (2006). Inicialmente, as películas foram imersas numa solução de cloreto de cálcio 100 mM (CaCl_2), durante 24h, sob agitação. Em seguida as películas foram imersas numa solução de fosfato de sódio dibásico 60 mM (Na_2HPO_4) por mais 24h, sob agitação. Após a mineralização da película, promovida pelos tratamentos anteriores, foram feitas algumas lavagens com água destilada para retirar o precipitado residual, completando o ciclo. Foram realizados 3 ciclos de imersão, os quais corresponderam a formação e incorporação da hidroxiapatita (HA) na película de celulose, com a finalidade dar condições para ocorrer tanto adsorção física na superfície do adsorvente, quanto troca de íons (Ca por Sr). Para finalizar a produção do material híbrido as películas formadas foram dopadas com estrôncio a partir da sua imersão em soluções de nitrato

de estrôncio na concentração de 100 mg/L promovendo a adsorção do metal no híbrido por batelada. Essa concentração de estrôncio foi definida devido a adequação da curva de detecção.

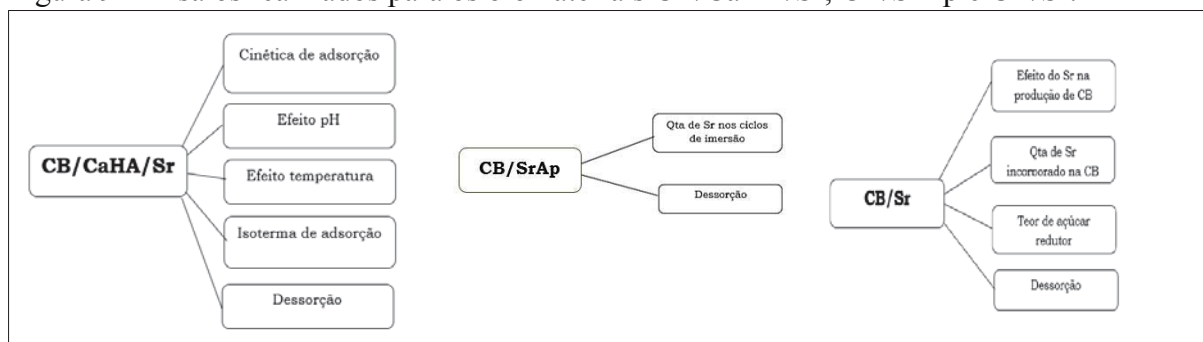
4.4 Produção do biomaterial celulose bacteriana e apatita de estrôncio (CB/SrAp).

O biomaterial foi produzido a partir de celulose bacteriana e as películas de CB formadas foram imersas em soluções que proporcionaram a formação de apatita de estrôncio. Para a formação de apatita de estrôncio foram necessários o uso de soluções de SrCl_2 e Na_2HPO_4 . Foram realizados 5 ciclos de imersão, visto que não havia necessidade de continuar as imersões, por causa da baixa incorporação do estrôncio. Essa etapa corresponde a precipitação química e formação de fosfatos de estrôncio sobre a CB.

4.5 Produção do biomaterial celulose bacteriana e estrôncio (CB/Sr).

Para preparação desse biomaterial foi incluído SrCl_2 no meio de cultivo da bactéria *G. hansenii*, produtora de celulose bacteriana com a finalidade de induzir no momento da formação de celulose o aprisionamento do estrôncio em sua estrutura, ou seja, o estrôncio foi incorporado a matriz de CB por co-condensação. O meio de cultivo HS foi previamente esterilizado à 121°C por 15 min. Depois de resfriado foi adicionado estrôncio ao meio de cultivo. Foram feitos tubos em duplicata contendo 20 mL de meio, cultivando 5% de inóculo e levados à incubadora por 6 dias à 30°C . A leitura foi feita durante os dias de formação da CB (3°, 4°, 5° e 6° dia). As películas foram pesadas e comparadas com o controle (sem adição de estrôncio). As análises realizadas para cada biomaterial sintetizado são apresentadas na Figura 9.

Figura 9 - Ensaio realizados para os biomateriais CB/CaHA/Sr; CB/SrAp e CB/Sr.

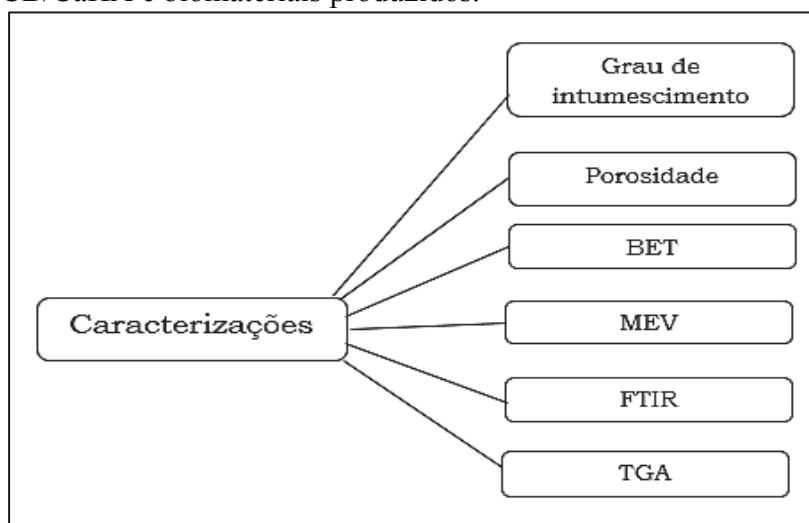


Fonte: Elaborada pela autora.

4.6 Caracterizações das matrizes CB e CB/CaHA e dos biomateriais produzidos

As matrizes CB e CB/CaHA e os biomateriais sintetizados (FIGURA 8) foram caracterizadas a fim de compreender a morfologia e a interação CB/CaHA, com o intuito de avaliar seus benefícios como matrizes e compará-las entre si. Outro ponto importante é a verificação se a interação de CB/CaHA é melhor para incorporação de Sr do que somente a CB. As caracterizações realizadas são apresentadas na Figura 10.

Figura 10 - Caracterizações realizadas com as matrizes CB e CB/CaHA e biomateriais produzidos.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.6.1 Grau de intumescimento

O grau de intumescimento foi realizado pelo método descrito por Liu *et al.*, (2005). As matrizes de CB e CB/CaHA e os biomateriais produzidos foram imersos em água destilada pH 7.1 e solução de estrôncio 100 mg/L em pH 6.0, com o objetivo de observar o comportamento de intumescimento nessas duas soluções. Após cada imersão dos materiais foi retirado o excesso de água com papel de filtro e pesado nos intervalos de 0, 1, 2, 7, 12, 22, 32, 52 e 72 minutos, à 25°C. O grau de intumescimento foi expresso como a porcentagem de ganho de massa, comparada com a massa inicial, de acordo com a Equação 4.

$$DS = \frac{W_s - W_d}{W_d} (100\%)$$

(Equação 4).

Sendo DS o grau de intumescimento, W_s a massa da amostra após imersão e W_d a massa da amostra seca anterior à imersão. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.6.2 Determinação da porosidade

Para determinar as medidas de porosidade dos materiais híbridos, as amostras foram pesadas previamente úmidas e após liofilização, com o intuito de calcular o volume total de poros, a partir do cálculo de volume de água contido no material. Para determinação dessas medidas utilizou-se o método descrito por Zeng e Ruckenstein (1996). A porosidade foi calculada através da Equação 5 e 6.

$$\varepsilon (\%) = \{(m_1 - m_2) / \rho_{\text{água}}\} 100 / v \quad (\text{Equação 5}).$$

Onde ε é a porosidade da membrana, m_1 e m_2 são pesos das massas úmidas e secas, $\rho_{\text{água}}$ é a massa específica da água à 20°C.

$$v = \frac{\pi \times D^2 \times h}{4} \quad (\text{Equação 6}).$$

Onde v é volume da membrana, D é o diâmetro e h é a altura.

4.6.3 Isotermas de Adsorção de N₂ – BET

Através de isotermas de adsorção-dessorção de N₂ foi possível determinar algumas características texturais das amostras analisadas. A verificação da área superficial e do diâmetro de poros das amostras foi obtida a partir de experimentos de adsorção/dessorção de nitrogênio à temperatura de 77K (-196°C), utilizando a técnica de BET, Brunauer, Emmett e Teller (1983). As análises foram realizadas no laboratório de Pesquisa em Adsorção e Captura de CO₂ da Universidade Federal do Ceará em um analisador de adsorção gasosa.

4.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

As informações sobre a morfologia das amostras foram obtidas a partir da análise de microscopia eletrônica de varredura. Para a realização das análises as amostras foram previamente liofilizadas e, em seguida, imersas em nitrogênio líquido, maceradas, fraturadas e cobertas com uma fina camada de ouro, para a obtenção das micrografias. Foram obtidas micrografias das matrizes CB, CB/CaHA e os biomateriais produzidos, essas análises foram realizadas na Embrapa Agroindústria Tropical utilizando microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM modelo 940, com tensão 15kV.

4.6.5 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho - FTIR

As análises de espectroscopia vibracional na região do infravermelho, foram realizadas com o intuito de confirmar a interação entre a celulose bacteriana e a hidroxiapatita. Essas análises foram realizadas no departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, utilizando um espectrofotômetro FTLA (2000-102, ABB-BOMEM), na região de 4000 a 400 cm^{-1} . Os materiais analisados foram dispersos na forma de pastilhas de KBr para a realização da análise.

4.7 Análise termogravimétrica - TGA

Análise termogravimétrica foi feita através de um analisador térmico simultâneo (modelo STA 449 F3 – JUPITER/ NETZSCH), sob as seguintes condições: numa faixa de 40-600°C, numa razão de aquecimento 10°C/min e numa vazão do gás de purga com 100 mL/min, utilizando uma massa aproximada de 3 mg de amostra. As análises foram realizadas no Centro de Tecnologias de Estratégias do Nordeste (CETENE).

4.8 Método analítico de quantificação de estrôncio

Soluções de Sr foram analisadas por Espectrometria de Absorção Atômica (AAS), em um comprimento de onda de 460 nm, que corresponde ao estrôncio. Lâmpadas de cátodo ôco de Sr, acetileno como gás combustível e ar como gás suporte foram utilizados para a determinação de estrôncio por AAS. Os valores fornecidos pelo espectrofotômetro estão em absorbância (Abs), por isso, foi plotado uma curva-padrão (1, 3, 5, 7, 10 e 20 ppm) obtida a partir da solução padrão de Sr (SpecSol) de referência ($\text{mg/L} \times \text{Abs}$) para a identificação das concentrações nas amostras. Na amostra analisada foi necessário adicionar o supressor KCl em uma concentração de 2000 mg/L de potássio e o removedor de interferentes, lantânio 1%, para aumentar a sensibilidade do equipamento, devido a utilização do gás ar-acetileno.

As medidas de concentrações de Sr analisadas foram realizadas no Laboratório Núcleo de Águas (LANAGUA) da Universidade Federal do Ceará, utilizando o espectrofotômetro de absorção atômica (AA240FS FAST Sequential Atomic Absorption Spectrometer).

4.9 Análises realizadas com o híbrido CB/CaHA/Sr

Os estudos de adsorção de estrôncio no híbrido CB/CaHA foram realizados com o intuito de identificar as melhores condições para obtenção de um material com maior

concentração de estrôncio adsorvido. O procedimento de adsorção do estrôncio resultou na formação do híbrido identificado como CB/CaHA/Sr.

4.9.1 Cinética de Adsorção

O estudo cinético foi realizado para encontrar o tempo de equilíbrio, utilizando soluções de Sr^{2+} na concentração de 100 mg/L. Foram colocadas películas de CB/CaHA (peso seco de 0,035 g) imersas nessas soluções de Sr em tubos de vidro e agitadas por um agitador de tubos rotativo à 150 rpm.

A cinética de adsorção foi realizada em batelada com uma solução fixa de 100 mg/L de Sr com uma quantidade fixa de adsorvente sob condições controladas temperatura (25°C) e pH (6,0). Em intervalos de 0,25; 0,5; 1; 2; e 3 horas foram medidas as concentrações residuais de estrôncio em solução por Espectrometria de Absorção Atômica (AAS), como descrito no item 4.6.

4.9.2 Efeito do pH

No estudo da influência do pH na adsorção de estrôncio no híbrido CB/CaHA, os experimentos foram realizados em batelada utilizando uma massa de 0,035g do híbrido à temperatura ambiente, por um período de 2 horas. Foram utilizadas soluções de Sr^{2+} na concentração de 100 mg/L em diferentes valores de pH variando numa faixa de 2,0 – 6,0. As soluções foram ajustadas utilizando NaOH 0,1M e HCl 0,1M.

4.9.3 Efeito da Temperatura

Para o estudo da influência da temperatura na adsorção de estrôncio no híbrido CB/CaHA, foram preparadas soluções de Sr^{2+} na concentração de 100 mg/L, pH 6,0, utilizando uma massa fixa de aproximadamente 0,035 g do híbrido, por um período de 2 horas. Os ensaios foram realizados para as temperaturas de 20°C, 25°C, 30°C e 40°C.

4.9.4 Isoterma de adsorção

A relação entre a quantidade de um soluto adsorvido por unidade de peso de um adsorvente, como função da concentração de soluto remanescente no equilíbrio, a uma dada temperatura é conhecida como *isoterma de adsorção*, que pode ser utilizada para descrever os mecanismos de adsorção através da correlação de dados experimentais com equações modelos.

As isotermas de adsorção deste trabalho foram obtidas através de ensaio em batelada, com a retirada das amostras do sistema e analisadas no espectrofotômetro de absorção atômica, utilizando 0,035 g de massa seca do material em 25 mL de soluções de Sr^{2+} numa faixa de concentração de 10-350 mg/L, pH 6,0, utilizando banho termostaticado à 25°C e à 40°C, sob agitação constante, durante um período de 2 horas. Ao final dos ensaios, alíquotas das soluções foram analisadas por AAS com o intuito de quantificar o estrôncio remanescente na solução.

4.10 Análises realizadas com o híbrido CB/SrAp

4.10.1 Quantificação de estrôncio a partir dos ciclos de imersão

Adsorção de Sr foi verificada através do acompanhamento do procedimento de síntese do híbrido (CB/SrAp) a partir dos ciclos de imersão da CB para produção de apatita de estrôncio. Foram realizados cinco ciclos de imersão, com a utilização de 100 mg/L e 1000 mg/L de Sr, com intervalos de lavagens e retirada da mineralização residual. Alíquotas das soluções de imersão foram analisadas por espectrometria de absorção atômica (AAS) para medir a quantidade de Sr residual da solução e conseqüentemente, determinar a quantidade de Sr adsorvido no material.

4.11 Análises realizadas com o híbrido CB/Sr

4.11.1 Efeito do estrôncio na produção de CB

A influência da adição de Sr ao meio de cultivo sobre a síntese de CB por *G. hansenii*, durante o processo de fermentação, foi avaliada em meio com e sem adição de Sr (0, 100, 500 e 1000 mg/L). As películas obtidas foram pesadas e comparadas com relação as suas massas correspondentes.

4.11.2 Teor de açúcar redutor

Foram retiradas alíquotas do meio de cultivo HS antes da incubação sem e com adição de Sr (HS inicial e HS/Sr inicial) e depois, com seis dias de incubação da bactéria *G. hansenii*, (HS final e HS/Sr final) filtradas por membrana para avaliar o consumo de açúcar pelo microrganismo. As amostras foram diluídas 50 vezes (1:50) retirando 1 mL em balão volumétrico de 50 mL e em seguida completado com água destilada até o menisco. O consumo de açúcar foi calculado de acordo com a Equação 7.

$$\text{Açúcar consumido (\%)} = (\Delta\text{S/Si}) \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Onde, $\Delta S = S_i - S_f$. **S_i** é a quantidade de açúcar inicial e **S_f** que é a quantidade de açúcar final.

A partir das amostras diluídas foram retirados 1 mL de cada uma delas e transferido para tubos de ensaio e foi adicionado 1 mL do reagente DNS, realizando agitações e colocando-as em banho maria a 100°C durante 5 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo e adicionamos mais 8 mL de água destilada aos tubos sob agitação. A leitura foi feita em espectrofotômetro num comprimento de onda de 540 nm. O branco consistiu em substituir o volume de amostra por água destilada (1 mL).

4.11.3 Quantificação de estrôncio incorporado na estrutura de celulose bacteriana

No 6° dia de incubação da *G. hansenii*, foram retiradas alíquotas do meio de cultivo para análise do Sr residual pelo AAS, para determinação de Sr incorporado na CB.

4.12 Estudo de dessorção

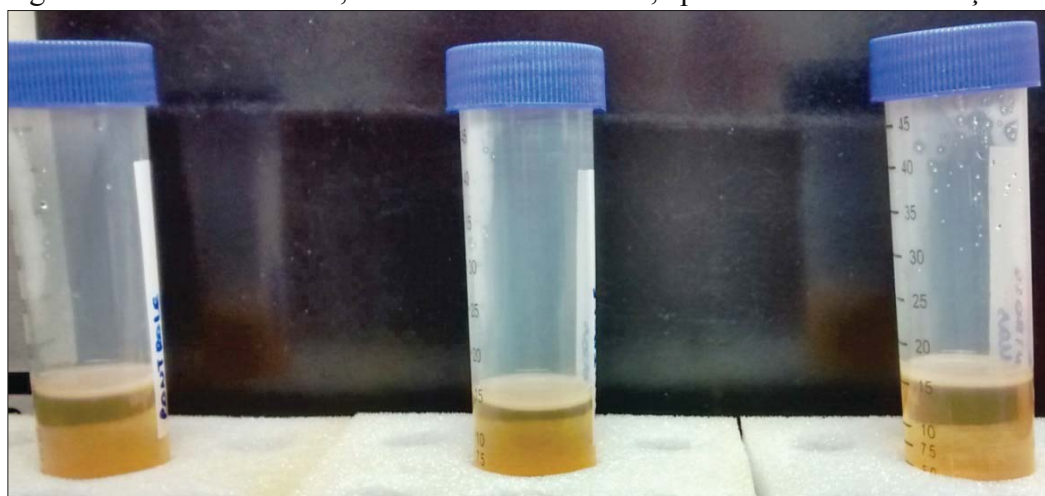
Para avaliar a quantidade de estrôncio que pode ser dessorvido de todos os materiais sintetizados, foram realizados ensaios utilizando 10 mL de tampão fosfato salino (PBS) de pH 7,4 à 37°C sob agitação. Esse procedimento foi repetido 8 vezes, nos seguintes intervalos (0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 24 e 26 horas). A cada ensaio foram coletadas alíquotas de 3mL da solução residual e analisadas por espectrometria de absorção atômica (AAS) para quantificação da quantidade de estrôncio dessorvido.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção da CB

A síntese de CB por *G. hansenii* em meio HS foi observada no terceiro dia de fermentação, porém com fina espessura e baixa resistência mecânica. Após seis dias de incubação à 30°C o polímero apresentou características adequadas para produção e materiais híbridos (FIGURA 11). Os polímeros obtidos foram purificados, autoclavados e armazenados sob refrigeração (4-5°C).

Figura 11 – Síntese de CB, em meio de cultivo HS, após 6 dias de fermentação.



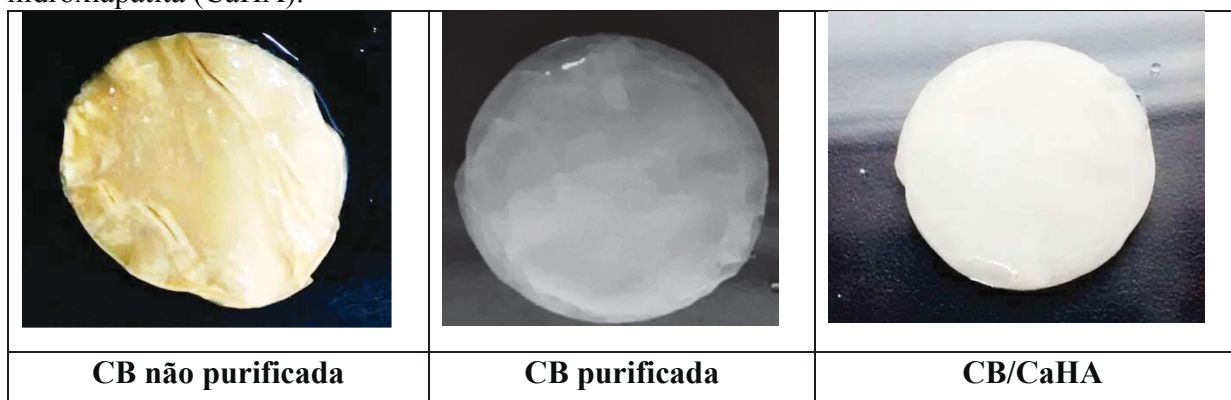
Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 Produção dos materiais híbridos.

Os híbridos são materiais formados por duas fases: inorgânica e orgânica. Essa combinação de constituintes visa complementar propriedades de diferentes materiais e ao final produzir um material diferenciado e com melhores propriedades. Dessa forma, o principal objetivo de se produzir um híbrido é aproveitar as vantagens de cada material, como por exemplo: os polímeros orgânicos são de baixa densidade, apresentam flexibilidade e são fáceis de processar. Já os materiais inorgânicos contribuem com alta resistência mecânica, química e estabilidade térmica (KARATAS *et al.*, 2009).

A matriz de celulose bacteriana produzida a partir de CB purificada e incorporada com hidroxiapatita são apresentadas nas Figuras 12 e 13.

Figura 12 - Diferentes fases de produção do material híbrido celulose bacteriana (CB) e hidroxiapatita (CaHA).



Fonte: Elaborada pela autora.

O híbrido obtido pela associação da celulose bacteriana com a hidroxiapatita possibilitou obtenção de um material semelhante ao osso humano, apresentando uma fase orgânica e inorgânica (FIGURA 12), pois a utilização da celulose bacteriana é adequada devido a sua biocompatibilidade, relativa flexibilidade, alta pureza, o que proporciona propriedades interessantes para utilização como um biomaterial. Já a hidroxiapatita apresenta propriedades de biocompatibilidade e osseointegração, além de ser um constituinte natural do osso.

O híbrido CB/CaHA apresentou a característica de relativa rigidez, porém, quebradiço depois de liofilizado (FIGURA 13). Essa característica dá indícios que o material sintetizado apresenta propriedades diferentes da celulose bacteriana de origem, já que a mesma apresenta uma elevada flexibilidade.

Figura 13- Matriz CB/CaHA liofilizada e após fratura.



Fonte: Elaborada pela autora.

A obtenção de biomateriais com estrôncio visou a potencialização do seu uso como um biomaterial, pois dados da literatura reporta sua ação farmacológica para indivíduos acometidos por osteoporose (MARIE *et al.*, 2011).

No estudo foram obtidos três tipos de materiais híbridos com estrôncio em sua estrutura, visando a aplicação para osseointegração. As fotografias desses materiais híbridos produzidos, podem ser observadas na Figura 14.

Este trabalho descreve pela primeira vez a produção de biomateriais à base de celulose bacteriana e hidroxiapatita dopados com estrôncio, favorecendo nas pesquisas em biomateriais visando aplicações futuras em osseointegração.

Figura 14 - Biomateriais produzidos dopados com estrôncio.



Fonte: Elaborada pela autora.

5.3 Caracterizações morfológicas das matrizes CB e CB/CaHA e dos biomateriais produzidos (CB/CaHA/Sr, CB/SrAp e CB/Sr).

5.3.1 Grau de intumescimento

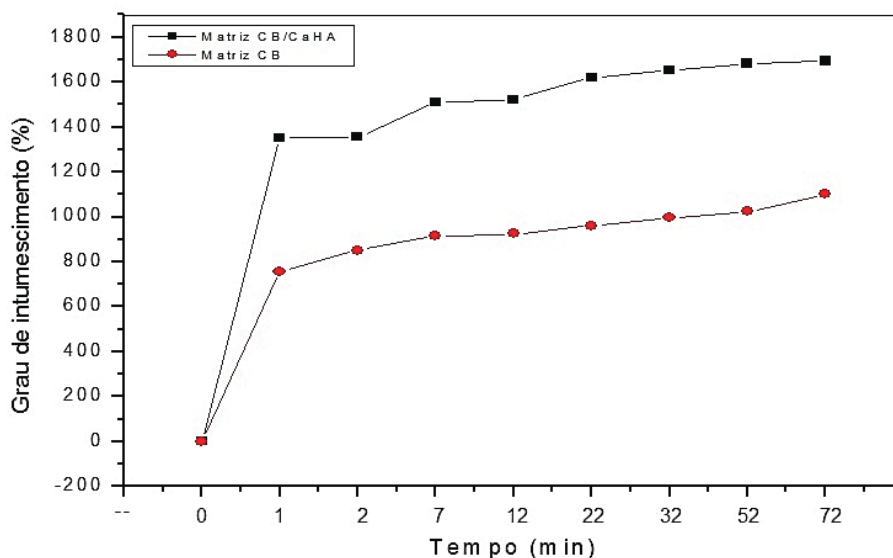
O grau de intumescimento é um teste que determina o aumento do volume do material imerso em algum solvente (MEI; LEITE; FELISBERTI, 1995). Os principais mecanismos que influenciam no intumescimento é a difusão do solvente penetrante e a estabilidade polimérica (DE ANGELIS; SEGRE; CRESCENZI, 2001). Esse processo de considerável importância, permite conhecer a interação do material com os solventes.

No estudo, foram utilizados dois solventes: água e solução de estrôncio. A solução de estrôncio foi utilizada com as matrizes CB e CB/CaHA para verificar a interação entre o polímero e esse solvente para posterior obtenção dos biomateriais incorporados com Sr.

O grau de intumescimento em solução de Sr foi distinto para as duas matrizes, sendo maior para a matriz CB/CaHA que obteve 1693% e para CB foi de 1152% (FIGURA 15).

Observou-se que a CB pura só consegue intumescer 1152%, já com a inserção da hidroxiapatita na CB, formando o híbrido CB/CaHA, há um aumento de 541%. Esse elevado grau de intumescimento para CB/CaHA pode ser explicado pela inclusão de um componente hidrofílico, demonstrando os benefícios da formação do híbrido CB/CaHA abrindo novas possibilidades para aplicações.

Figura 15 – Grau de intumescimento (%) das matrizes CB e CB/CaHA em solução de estrôncio (100 mg/L) e pH 6,0.



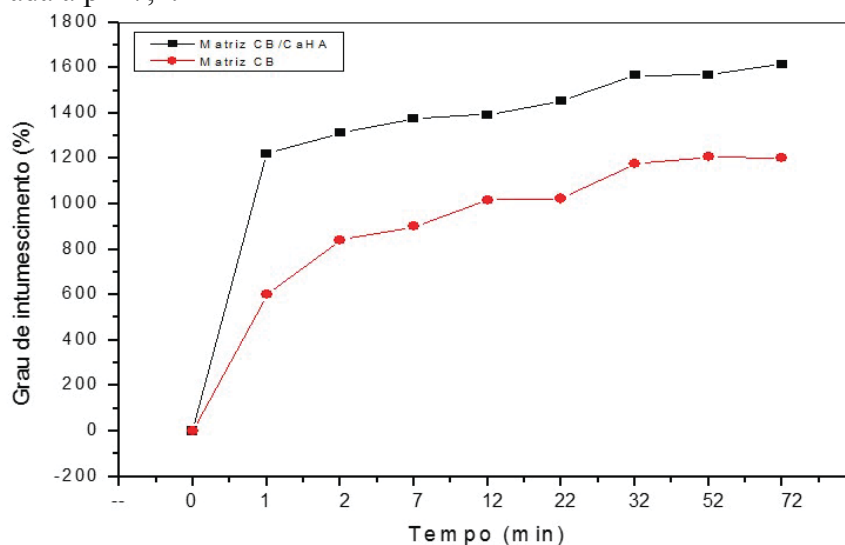
Fonte: Elaborada pela autora.

Outro fator relevante constatado foi a boa interação das duas matrizes com a solução de estrôncio, a qual foi imprescindível para obtenção dos biomateriais, pois proporcionou maior interação do estrôncio com a superfície do material.

Saibuatong e Phisalaphong (2010) também observaram o benefício de combinação de materiais quando adicionaram Aloe vera no meio de cultivo da bactéria produtora de celulose. Os autores observaram aumentos significativos, principalmente, relacionados a capacidade de absorção de água e permeabilidade ao vapor de água.

As matrizes CB e CB/CaHA, apresentaram maior grau de intumescimento quando imersas na solução de Sr do que na imersão na água (FIGURA 15 e 16), indicando que o pH pode ter influenciado esse perfil. Os solventes utilizados com pH distintos, a solução de Sr apresentava pH de 6,0 e água destilada pH em torno de 7,1. O híbrido intumesciu mais em meio ácido do que em neutro, propiciando uma maior afinidade com o polímero.

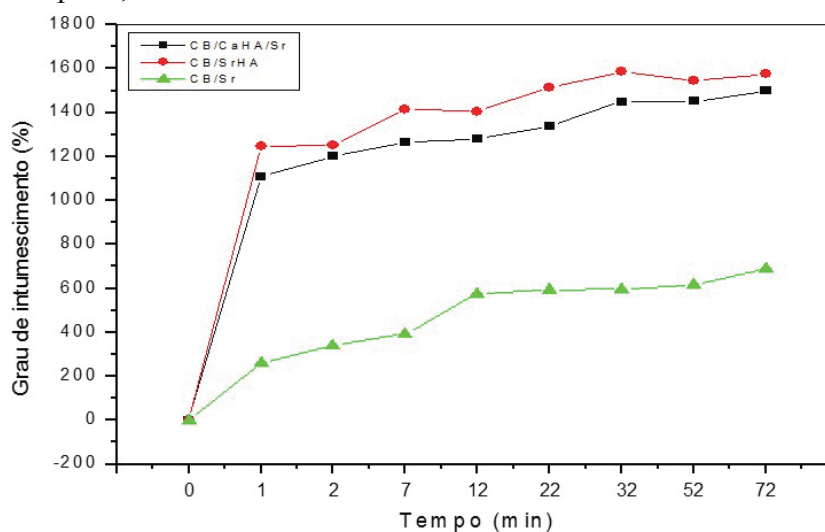
Figura 16 – Grau de intumescimento das matrizes CB e CB/CaHA em água destilada à pH 7,1.



Fonte: Elaborada pela autora.

Rubira *et al.* (2009), avaliaram a morfologia de hidrogéis-IPN Termo-sensíveis e pH-responsivos para aplicação como biomaterial em cultura de células e constataram que em meio ácido os íons Ca^{2+} presentes no hidrogel constituído de alginato-Ca foram substituídos por H^+ formando grupos $-\text{COOH}$ causando uma mobilidade dos segmentos poliméricos e facilitando a interação com o solvente. Os autores observaram ainda que em meio neutro, as concentrações de H^+ e OH^- eram análogas e interagiram entre si, evitando a interação com a matriz polimérica, causando a redução no intumescimento.

Figura 17 – Grau de intumescimento dos biomateriais produzidos (CB/CaHA/Sr, CB/SrHA, CB/Sr) em água à pH 7,1.



Fonte: Elaborada pela autora.

A absorção dos biomateriais produzidos ocorreu rapidamente, indicando que a estrutura deles facilitou a penetração da água permitindo uma interação com a matriz polimérica, atingindo o equilíbrio com 32 minutos. O biomaterial CB/SrAp teve o melhor desempenho dentre os materiais produzidos. Por ordem de intumescimento $CB/Sr < CB/CaHA/Sr < CB/SrAp$, com valores de 690%; 1497% e 1575%, respectivamente (FIGURA 17). O CB/Sr não apresentou bom desempenho na absorção de água devido prejuízos estruturais desencadeados pela inserção do estrôncio.

De acordo com os resultados obtidos, todas as amostras demonstram ser hidrofílicas devido a matriz polimérica constituinte de celulose bacteriana, mas, diferiram quanto ao nível de afinidade. Sugere-se que essa possível influência esteja relacionada com a afinidade da água com os grupamentos do polímero e da hidroxiapatita.

5.3.2 Determinação da porosidade

A quantificação percentual de porosidade das amostras, facilita a interpretação dos resultados, pois os poros são responsáveis pelo favorecimento dos fenômenos de adsorção.

A porosidade do material híbrido CB/CaHA foi 30% superior ao da matriz CB (TABELA 1) demonstrando que a hidroxiapatita também é um material poroso. A interação da CB com a hidroxiapatita contribuiu para a melhoria nas características desse compósito (CB/CaHA) tanto na estabilidade química bem como para uma maior disponibilidade de poros. Concordando com análise de BET, que mostra atingir uma maior adsorção com o material híbrido.

Tabela 1 - Porosidade média das matrizes CB e CB/CaHA.

<i>Amostras</i>	<i>Massa úmida (g)</i>	<i>Massa seca (g)</i>	<i>ϵ %</i>	<i>ϵ média (%)</i>
<i>Matriz CB</i>	0,385	0,021	49,50	53,04±3,53
	0,447	0,031	56,57	
<i>Matriz CB/CaHA</i>	0,850	0,045	82,12	83,39±1,27
	0,871	0,041	84,66	

Fonte: Elaborada pela autora.

Obs: As análises foram realizadas com duas repetições, onde a espessura do híbrido e da celulose bacteriana corresponde a $2,0 \pm 0,3$ mm e $1,5 \pm 0,1$ mm, respectivamente.

A porosidade da matriz CB/CaHA foi de 83% (TABELA 1), demonstrando ser um material com elevada porosidade, o que favorece a adsorção. A capacidade de adsorção está relacionada com as propriedades texturais do material, principalmente, a determinação da sua porosidade que facilita a interação entre o adsorbato e adsorvente.

Verificou-se que o biomaterial CB/SrAp apresentou 83% de porosidade em sua estrutura, sendo o mais poroso entre os biomateriais obtidos, seguido de CB/CaHA/Sr com 72% e CB/Sr com 22% (TABELA 2). Sugere-se que a elevada porosidade do biomaterial CB/SrAp, pode ser atribuída aos vários ciclos de imersão que foi submetido para formação de hidroxiapatita de estrôncio. O CB/Sr mostrou-se o biomaterial menos poroso.

Tabela 2 – Valores médios da porosidade dos materiais híbridos incorporados com Sr.

<i>Amostras</i>	<i>Massa úmida</i> (g)	<i>Massa seca</i> (g)	ϵ %	ϵ média (%)
<i>CB/CaHA/Sr</i>	0,787	0,039	72,67	72,08±0,58
	0,776	0,040	71,50	
<i>CB/SrAp</i>	0,999	0,046	84,53	83,82±0,71
	0,981	0,044	83,11	
<i>CB/Sr</i>	0,141	0,017	22,99	22,71±0,27
	0,140	0,019	22,44	

Fonte: Elaborada pela autora.

Obs: As análises foram realizadas com duas repetições, onde a espessura do CB/CaHA/Sr; CB/SrAp e da CB/Sr corresponde a $2,1 \pm 0,2$ mm; $2,4 \pm 0,6$ mm e $1,1 \pm 0,3$ mm, respectivamente.

5.3.3 Isotermas de Adsorção de N₂ – BET

A determinação e a avaliação das propriedades texturais de um material como: área superficial, volume e diâmetro de poros são extremamente importantes para o processo de adsorção, considerando que essas propriedades determinarem a acessibilidade do adsorbato aos sítios de adsorção contidos no material adsorvente (GOMES, 2010).

As áreas superficiais dos materiais foram determinadas através do método de BET e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3- Propriedades texturais das matrizes CB e CB/CaHA obtidas através das isotermas de adsorção de nitrogênio

<i>Amostra</i>	<i>Volume específico</i> <i>de poros</i> (cm^3/g)	<i>Diâmetro Médio de</i> <i>poros</i> (Å)	<i>Área superficial</i> <i>específica</i> (m^2/g)
<i>Matriz CB</i>	0,102	183	22
<i>Matriz CB/CaHA</i>	0,354	240	59

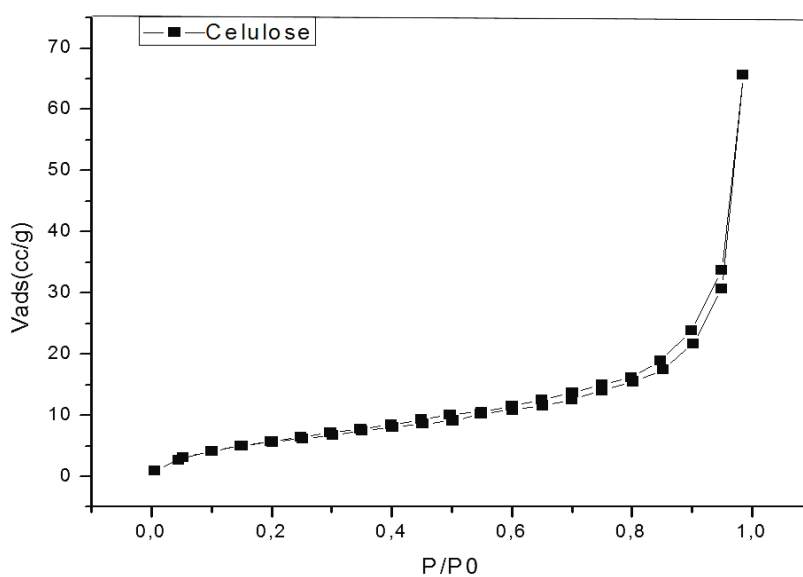
Fonte: Elaborada pela autora.

As medidas de área superficial, volume específico de poros e diâmetro médio de poros da matriz de CB foram inferiores as medidas obtidas para o híbrido CB/CaHA (TABELA 3). Esse resultado indica que a interação CB/CaHA proporcionou um aumento de $36,71 m^2/g$ (164,76%) da área superficial.

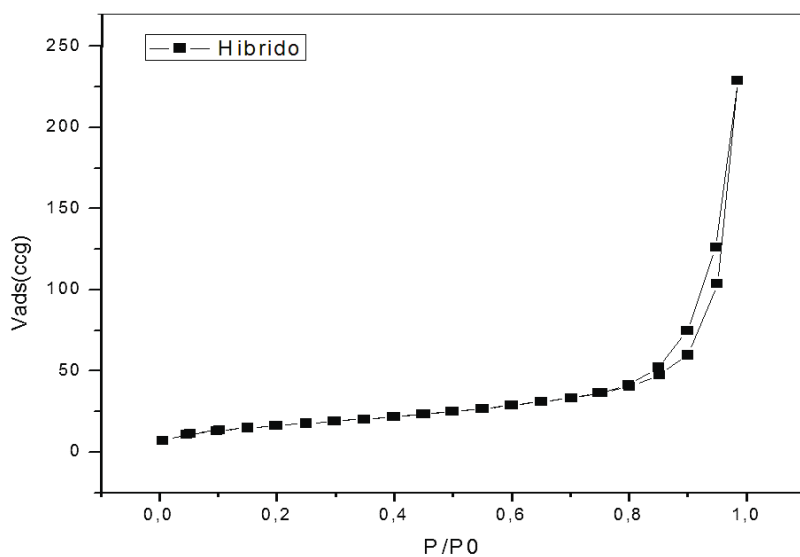
A hidroxiapatita é um sólido inorgânico que apresenta uma área superficial em torno de $17,18 \pm 3,88 \text{ m}^2/\text{g}$ (LACERDA, 2005), sendo menor que área superficial da CB, evidenciando o benefício da interação CB e HA, com o aumento total da porosidade o que resulta em uma maior área superficial específica.

As isotermas de adsorção de nitrogênio para as amostras de celulose e do híbrido CB/CaHA, são apresentadas na Figura 18. Observa-se um perfil de isotermas do tipo IV que é característica de materiais mesoporosos segundo a classificação da IUPAC, onde a curva de adsorção apresenta histerese que está relacionada a não sobreposição das curvas de adsorção e dessorção. Segundo Gregg e Sing (1982), este comportamento está associado ao fenômeno de condensação capilar que justifica o aumento da adsorção em sólidos mesoporosos quando comparados a sólidos não-porosos.

Figura 18 - Isoterma de adsorção de nitrogênio das matrizes CB (a) e CB/CaHA (b) à 77K.



(a)



(b)

Fonte: Elaborada pela autora.

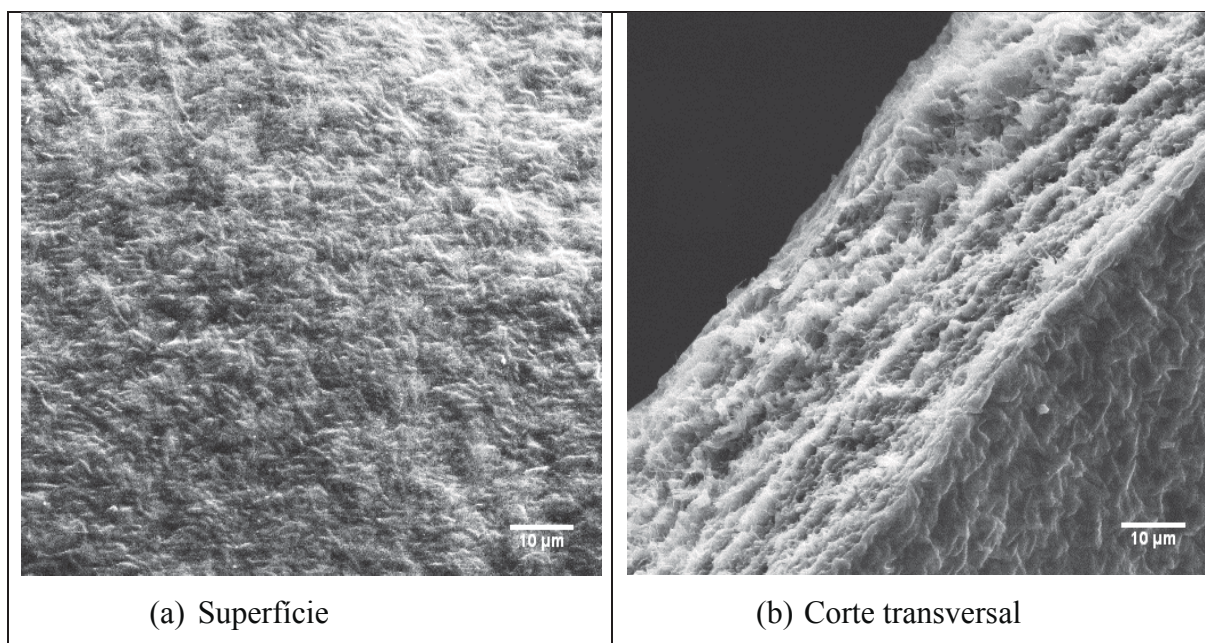
5.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica que contribui para se conhecer a morfologia do material. Na produção de novos materiais, são necessárias informações sobre as microestruturas do material produzido. Alta resolução dessa técnica proporciona uma visualização detalhada do material analisado, que são úteis para a interpretação das morfologias.

5.3.4.1 MEV das matrizes CB e CB/CaHA

As eletromicrografias do MEV facilitam a visualização da morfologia da matriz de CB. Na Figura 19 (b), observou a porosidade da CB, na qual visualizou-se poros interconectados e a irregularidade do tamanho dos poros, já a uniformidade das fibras de celulose pode ser melhor observada na Figura 19 (a). As fibras contidas na CB formam camadas que constituem uma rede com poros irregulares. A espessura do corte transversal da eletromicrografia da CB variou em função do tipo da amostra e maceração.

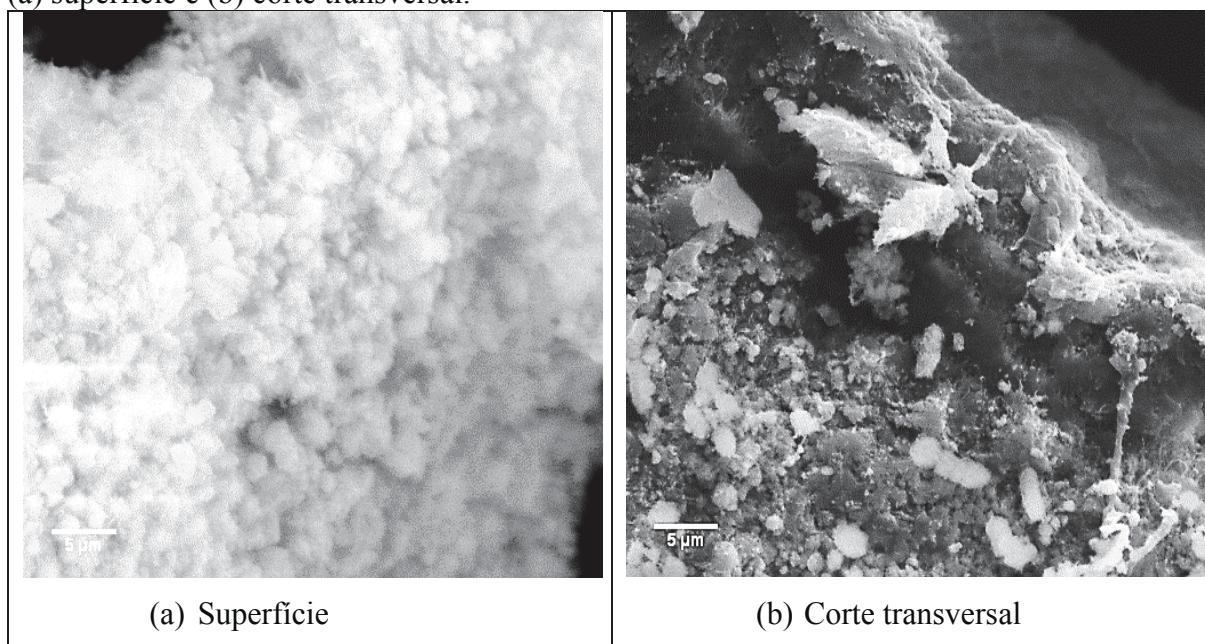
Figura 19 - Eletromicrografias da matriz celulose bacteriana (CB) (a) superfície e (b) corte transversal.



Fonte: Elaborada pela autora.

A CB estruturalmente apresenta fibrilas muito finas, sendo considerado um material altamente poroso e que possibilita a transferências de fármacos, além disso, serve como barreira física. Sendo utilizada na cicatrização de tecidos (CZAJA *et al.*, 2006).

Figura 20 - Eletromicrografias da matriz celulose bacteriana (CB) com hidroxiapatita (CaHA) (a) superfície e (b) corte transversal.



Fonte: Elaborada pela autora.

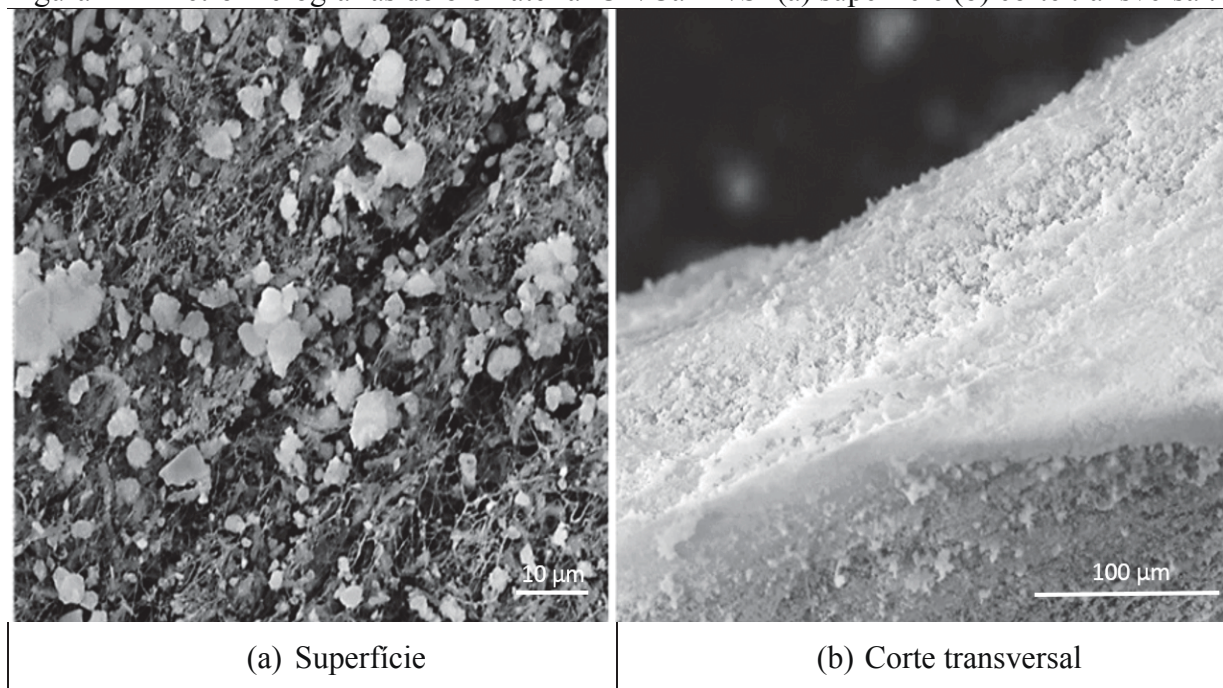
Na Figura 20, foi possível identificar a morfologia das fibras de celulose contendo hidroxiapatita, que mostrou a mudança no perfil de porosidade quando comparado com a matriz de CB (FIGURA 19 b). Para obtenção desse resultado seria necessário a utilização de um equipamento mais apropriado, como o microscópio de transmissão para conseguir captar a porosidade da hidroxiapatita depositada. A deposição da hidroxiapatita em formas globulares na superfície do material pode ser visualizada na Figura 20 (b). Nas eletromicrografias visualizou-se a imagem típica da hidroxiapatita, a qual é formada por cristais de fosfatos de cálcio de fase única.

Os cristais de hidroxiapatita com formas globulares típicas foram observados também por Saska *et al.*, (2009) que desenvolveram nanocompósitos de hidroxiapatita e celulose bacteriana para regeneração óssea.

A importância da hidroxiapatita na formação do tecido ósseo está relacionada à ação de facilitar a multiplicação dos fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas. Sua compatibilidade com os tecidos ósseos é devido a sua semelhança química superficial e sua capacidade de permutar os íons com meio fisiológico tendendo ao equilíbrio implante-osso (NEJATI; MIRZADEH; ZANDI, 2008).

5.3.4.2 MEV dos três biomateriais produzidos dopados com Sr.

Figura 21 - Eletromicrografias do biomaterial CB/CaHA/Sr (a) superfície (b) corte transversal.

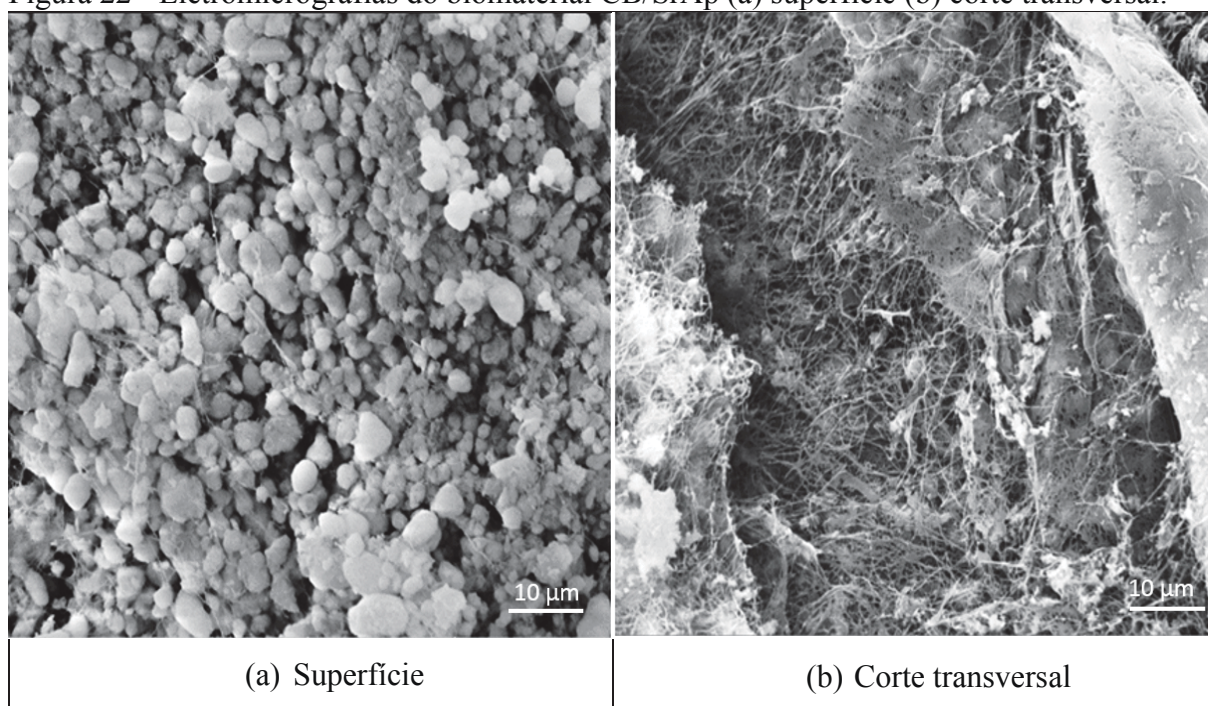


Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 21 (a) foi visualizado e encontrado, comparativamente, a depósitos de hidroxiapatita mostrando sua similaridade com a matriz CB/CaHA sem significativas mudanças estruturais pela inserção de estrôncio. A hidroxiapatita encontrada é semelhante as encontradas na literatura (MOREJON-ALONSO; CARRODEGUAS; GARCÍA-MENOCAL, 2008).

Na Figura 21 (b) foi a uniformidade do tratamento de precipitação química realizado para formação da hidroxiapatita. Pelas micrografias foi constatada a deposição da hidroxiapatita sobre as fibras de CB e seu preenchimento na superfície do material e entre as fibras e microfibrilas.

Figura 22 - Eletromicrografias do biomaterial CB/SrAp (a) superfície (b) corte transversal.

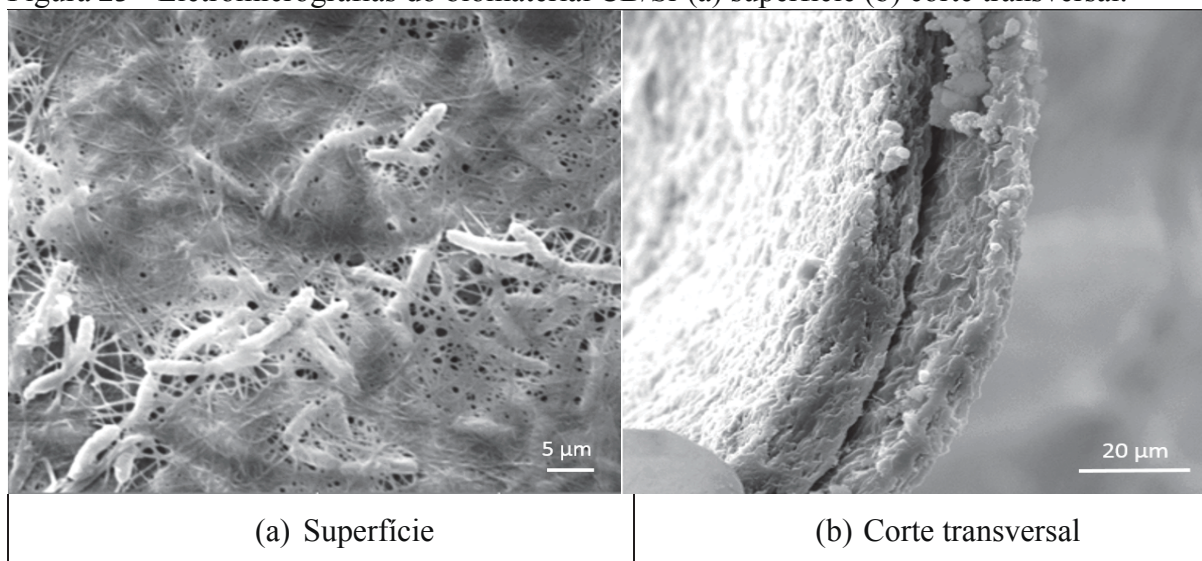


Fonte: Elaborada pela autora.

A presença de apatita visualizada na superfície da CB (FIGURA 22 a), mostrou que a apatita formada, predominantemente, por fosfatos de estrôncio apresentou características morfológicas similares as da hidroxiapatita formada por fosfatos de cálcio, sendo também formas globulares. A incorporação de apatita de estrôncio não afetou a forma estrutural da CB (FIGURA 22 b) demonstrado que sua formação predominou na superfície da CB.

Melnikov e Gonçalves, (2015) que sintetizaram e caracterizaram hidroxiapatita de estrôncio, $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, para aplicações ortopédicas descreveram suas micrografias de hidroxiapatita de estrôncio como apresentando uma superfície rugosa com grânulos irregulares e com o aumento da temperatura esses grânulos aumentam de tamanho.

Figura 23 - Eletromicrografias do biomaterial CB/Sr (a) superfície (b) corte transversal.



Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 23 (a) sugere-se pela microscopia que o Sr esteja entre as fibras, resultando sendo mostrada por manchas escuras sobre a membrana, podendo ter causado uma má construção da rede celulósica, sendo explicado pelo seu baixo rendimento. A literatura reporta que híbridos formados por co-condensação podem apresentar má formação estrutural devido a presença de grupos indesejáveis (COSTA, 2012).

A amostra CB/Sr não foi submetida ao tratamento de purificação na tentativa de não mascarar o prejuízo provocado pelo Sr e para que fosse visualizado o real dano na membrana, porém, na Figura 23 (a) foi identificado a presença da *G. hansenii* com sua morfologia de bastonetes incrustada na película. A etapa de purificação é responsável também pela remoção dos resquícios microbianos.

Na Figura 23 (b) pode-se observar deformações na estrutura do material, causando um espaçamento incomum entre as fibras sugerindo que o estrôncio pode ter influenciado numa fragilidade demasiada da membrana de CB causando a perda de sua elevada de resistência mecânica como as encontradas nas membranas de CB puras.

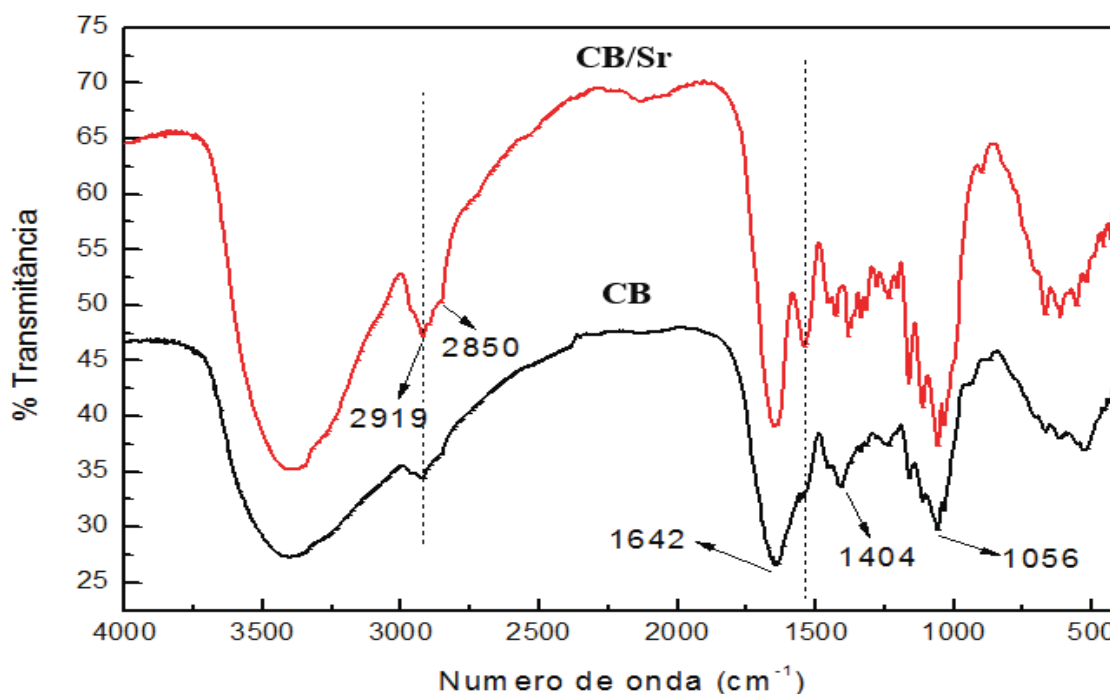
5.3.5 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho - FTIR

As análises de infravermelho dos biomateriais produzidos, foram realizadas com o intuito de caracterizar os grupos funcionais existentes em cada um dos materiais, além de investigar a interação existente entre a matriz de celulose bacteriana e a hidroxiapatita.

Os espectros das amostras de CB e CB/Sr, foram similares (FIGURA 22), dando evidências apenas da estrutura da celulose bacteriana. Para a amostra CB/Sr não foi visualizado o deslocamento de bandas comparativamente com as bandas do espectro da amostra CB, sugerindo que a interação existente entre a celulose e o estrôncio na amostra CB/Sr é apenas física.

Analisando os espectros vibracionais das duas amostras (FIGURA 22), observou-se que ambas apresentaram bandas em 2919 e 2850 cm^{-1} , as quais podem ser atribuídas a estiramento de CH, uma banda larga em torno de 3420 cm^{-1} referente ao estiramento OH da estrutura da celulose, uma banda em 1642 referente a deformação angular de HOH e outras bandas de menor intensidade aparecem entre as regiões de 1000 a 1600 cm^{-1} e que podem ser atribuídas aos grupamentos CH existentes na cadeia cíclica do polímero (PINTO, 2007).

Figura 24 - Espectros vibracionais na região do infravermelho da CB e do híbrido CB/Sr

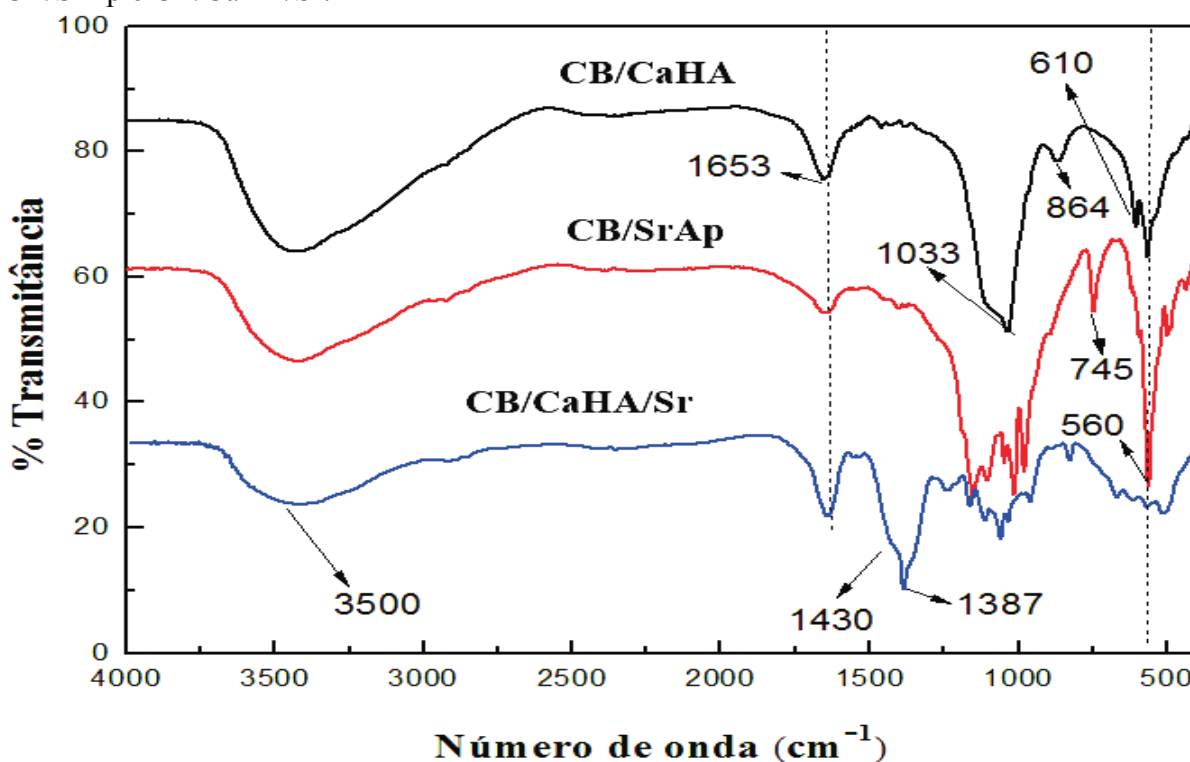


Fonte: Elaborada pela autora.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras híbridas CB/CaHA, CB/SrAp e CB/CaHA/Sr são apresentados na Figura 24.

Nos espectros vibracionais das amostras CB/CaHA e CB/SrAp não foi possível observar as bandas de absorção referente a estrutura da CB, sugere-se que isto ocorreu devido as intensas absorções do esqueleto estrutural da hidroxiapatita e da menor proporção de CB existente nesses materiais. Já no espectro vibracional da amostra CB/CaHA/Sr observou-se que algumas bandas que estão relacionadas a estrutura da CB. Essa observação corrobora com a evidência experimental indicando o resultado de que a realização de três ciclos de incorporação de hidroxiapatita implicou também em uma menor proporção de hidroxiapatita em relação a quantidade de celulose no híbrido, quando comparada com a incorporação de apatita com cinco ciclos de imersão (FIGURA 25).

Figura 25 - Espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras híbridas CB/CaHA, CB/SrAp e CB/CaHA/Sr.



Fonte: Elaborada pela autora.

Uma tentativa de atribuição das absorções observadas nos espectros vibracionais dos materiais híbridos analisados está resumida na Tabela 04 e associadas as atribuições relatadas na literatura (MAXIMILIANO, 2016; YUKHNEVICH, 1973; BHATNAGAR, 1967; REHMANL, 1997).

Tabela 04 - Atribuições prováveis das bandas de absorção dos biomateriais produzidos.

<i> Materiais </i>	<i> Número de onda (cm⁻¹) </i>	<i> Atribuições </i>
<i>CB/CaHA</i>	3500	Estiramento de grupos OH
	1100, 1033 e 950	Deformação assimétrica do grupamento PO ₄ ³⁻
	1653	Deformação angular de OH de água adsorvida
	864	Estiramento P-O(H)
	610	Deformação angular dos grupos fosfatos
	560	Deformação assimétrica P-O(H)
<i>CB/SrAp</i>	3500	Estiramento de grupos OH
	1100, 1033 e 950	Deformação assimétrica do grupamento PO ₄ ³⁻
	1653	Deformação angular de OH de água adsorvida
	745	Estiramento P-O(H)
	610	Deformação angular dos grupos fosfatos
	560	Deformação assimétrica P-O(H)
<i>CB/CaHA/Sr</i>	3500	Estiramento de grupos OH
	1653	Deformação angular de OH de água adsorvida
	1430	Deformação angular de CH ₂
	1387	Deformação angular de CH ₃
	560	Deformação assimétrica P-O(H)

Fonte: Elaborada pela autora.

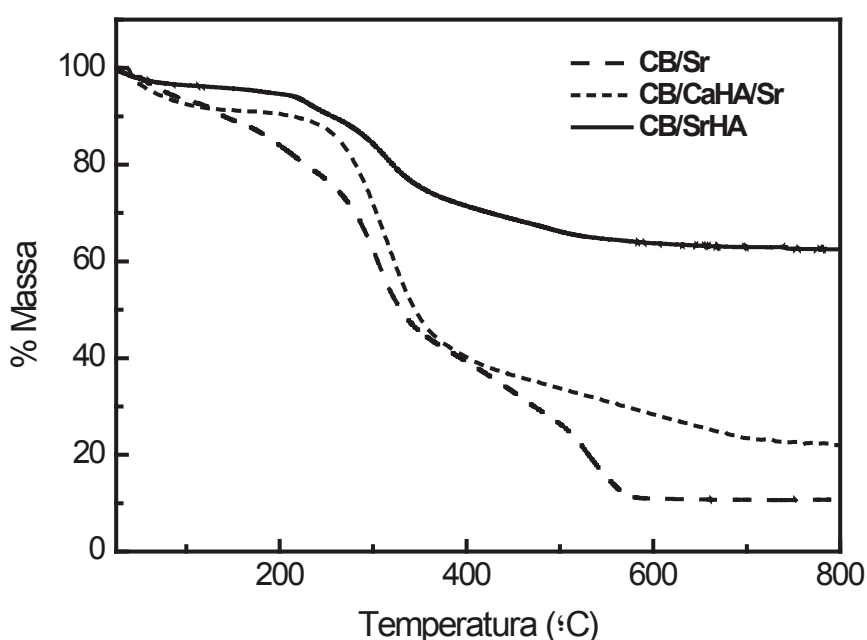
5.3.6 Análise Termogravimétrica- TGA

A análise termogravimétrica é uma técnica termoanalítica que acompanha a variação de massa de uma amostra em função da variação da temperatura. Dessa forma, a TGA das amostras híbridas produzidas foi realizada com o propósito de avaliar a estabilidade térmica dos materiais e verificar as perdas de massa proveniente da decomposição da estrutura orgânica existente nas amostras.

As curvas termogravimétricas obtidas das amostras de CB/Sr, CB/CaHA/Sr e CB/SrAp podem ser observadas na Figura 26. Analisando comparativamente essas curvas observou-se que a perda de massa total equivalente a decomposição do material orgânico, correspondeu a perda de massa ocorrida a partir da decomposição da estrutura da celulose bacteriana contida nas amostras híbridas.

A amostra de CB/SrAp apresentou a menor perda de massa total (38%) dentre as amostras analisadas. Isso corrobora com a evidência experimental (FIGURA 26) de que para essa amostra foram realizados mais ciclos de incorporação de apatita, quando comparado com a amostra CB/CaHA/Sr, o que sugere uma maior proporção de hidroxiapatita na estrutura do híbrido. A amostra CB/CaHA/Sr apresentou uma perda de massa total de 78% indicando que nesta amostra híbrida a proporção, em termos de massa, de celulose bacteriana é consideravelmente maior que a proporção de hidroxiapatita.

Figura 26 – Análise termogravimétrica das amostras híbridas CB/CaHA, CB/SrAp e CB/CaHA/Sr.



Fonte: Elaborada pela autora.

Na curva termogravimétrica da amostra de CB/Sr (FIGURA 26) observou-se uma primeira perda de massa em aproximadamente 100°C referente evaporação de água fisicamente adsorvida a estrutura da CB.

Dados da literatura indicam que em temperaturas mais elevadas ocorre uma perda de massa referente aos processos de despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas seguida pela formação de resíduos de carbono (SASKA *et al.*, 2011; WAN *et al.*, 2006).

5.4 Estudo de adsorção

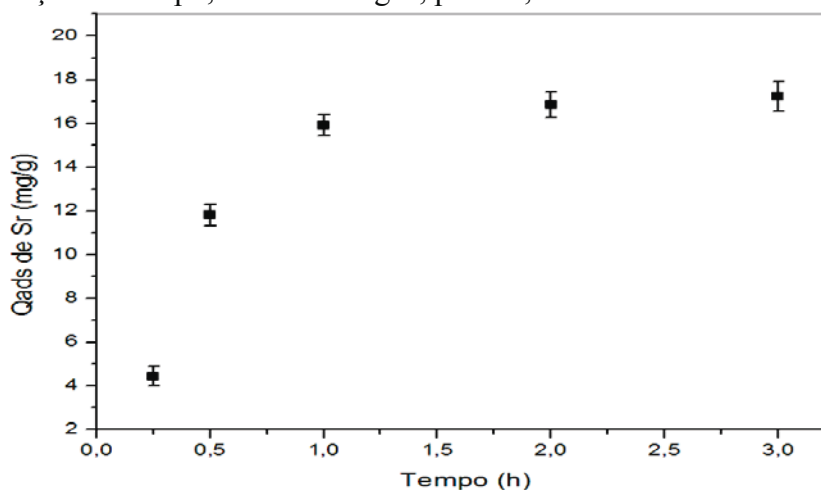
5.4.1 Análises realizadas para obtenção do biomaterial CB/CaHA/Sr

5.4.1.1 Cinética de Adsorção

O processo de adsorção envolve transferência de massa líquida para o adsorvente. A adsorção de Sr ocorreu, principalmente, na superfície do material e adsorveu 17,22 mg de Sr/g do adsorvente. Quando atingiu o tempo de equilíbrio a superfície se encontrava saturada, não houve diferença significativa na concentração de equilíbrio de 2 a 3 horas, indicando uma relação de equilíbrio, na qual a adsorção dos íons Sr pelo híbrido CB/CaHA tornou-se constante, mostrando que os sítios ativos estavam ocupados.

A cinética de adsorção foi realizada para determinar o tempo ótimo de adsorção dos íons Sr pelo híbrido CB/CaHA. Os resultados apresentados na Figura 27 indicaram que o tempo de equilíbrio foi de duas horas e que a remoção de íons Sr na fase fluida em relação ao tempo apresentou uma cinética de adsorção favorável.

Figura 27 – Cinética de adsorção de Sr^{2+} pela matriz CB/CaHA em função do tempo, $C_0 = 100 \text{ mg/L}$, $\text{pH} = 6,0$.



Fonte: Elaborada pela autora.

Wang *et al.* (2009), estudaram o comportamento de adsorção de íons Sr (II), em géis à base de derivados de polissacarídeos, onde um dos materiais analisados é a carboximetilcelulose (CMC). E constataram que esse polissacarídeo alcançou a capacidade máxima de adsorção bem mais rápida que a observada para o híbrido (CB/CaHA), sendo preciso apenas 1 h para atingir o equilíbrio. A diferença do resultado pode estar relacionada a quantidade de massa utilizada, a velocidade de agitação, entre outros.

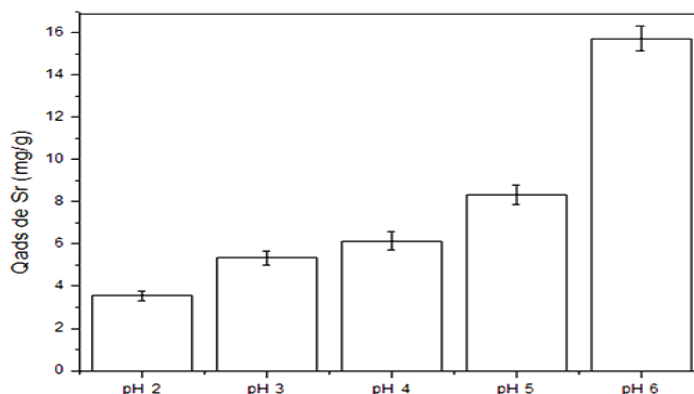
Chen *et al.* (2008), compararam a adsorção de íons cobre e chumbo em membranas de CB adicionada de carboximetilcelulose (CMC) e em membranas de CB pura. Os autores verificaram que a capacidade de adsorção de íons metálicos por membranas de celulose bacteriana produzida com carboximetilcelulose (CMC) foi maior do que na membrana pura e os valores de adsorção obtidos foram 9,67 mg Cu/g, 22,56 mg Pb/g de CB e 12,63 mg Cu/g, 60,42 mg Pb/g de CB(CMC).

5.4.1.2 Efeito do pH

O pH é um parâmetro essencial na avaliação da adsorção, pois facilita na otimização das condições para o sistema de adsorção. As cargas do adsorvente e do adsorbato devem ser opostas para proporcionar uma interação eletrostática.

Os resultados obtidos (FIGURA 28) demonstraram que a capacidade de adsorção foi dependente do pH, pois houve uma redução na adsorção de íons Sr em pH mais ácidos, podendo ser explicado pela possível repulsão das cargas superficiais do material com o adsorbato, pois terem cargas iguais. A maior adsorção para o híbrido CB/CaHA ocorreu em pH 6,0. Em pH mais ácido a adsorção foi baixa.

Figura 28 - Efeito do pH na adsorção de Sr^{2+} pelo híbrido CB/CaHA, Co = 100 mg/L, pH variando de 2,0 à 6,0.



Fonte: Elaborada pela autora.

Neste caso, para o estudo de adsorção é necessário a utilização de uma faixa de pH onde a carga superficial do material seja carregada negativamente, já que o adsorbato utilizado é um cátion. Por isso, nos ensaios de adsorção foram utilizados o pH natural de solução, pois demonstra-se mais adequado.

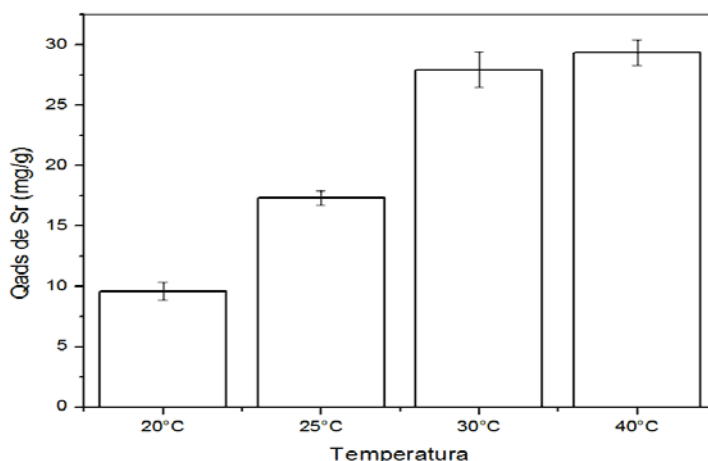
Nishiyama *et al.*, (2016) também constataram a dependência do pH na adsorção de íons Sr em materiais de hidroxiapatita. Eles produziram cinco tipos de materiais e testaram suas propriedades de adsorção de Sr^{2+} constataram que quatro tipos de HA obtidas removeram de forma eficiente os íons Sr como as partículas de zeólitas. Na avaliação do efeito do pH ótimo de adsorção. Os autores verificaram que com o aumento do pH houve o aumento de adsorção e que o valor mais alto de adsorção foi em pH 6,0.

5.4.1.3 Efeito da temperatura

A temperatura é considerada um fator limitante em um sistema de adsorção. Dessa forma, o efeito da temperatura na adsorção do Sr pelo híbrido CB/CaHA foi avaliado em quatro temperaturas (20°C, 25°C, 30°C e 40°C).

Os valores de adsorção obtidos nas temperaturas 20°C, 25°C, 30°C e 40°C foram 9,59; 17,32; 27,93; 29,36 mg de Sr/g de adsorbente, respectivamente (FIGURA 29). O aumento de temperatura de 20°C para 25°C proporcionou a adsorção de 7,73 mg/g e quando a temperatura elevou de 25°C para 30°C observou-se uma adsorção de 10,61 mg/g. Entre as temperaturas de 30°C e 40°C, não houve aumento significativo, o valor obtido foi de 1,43 mg de Sr por g de adsorbente. Esse resultado indicou que 40°C é a temperatura limite para aumento significativo na adsorção de Sr do híbrido CB/CaHA.

Figura 29 – Efeito da temperatura na adsorção de Sr^{2+} por CB/CaHA, $C_0 = 100 \text{ mg/L}$, Temperatura variando de 20 à 40°C.



Fonte: Elaborada pela autora.

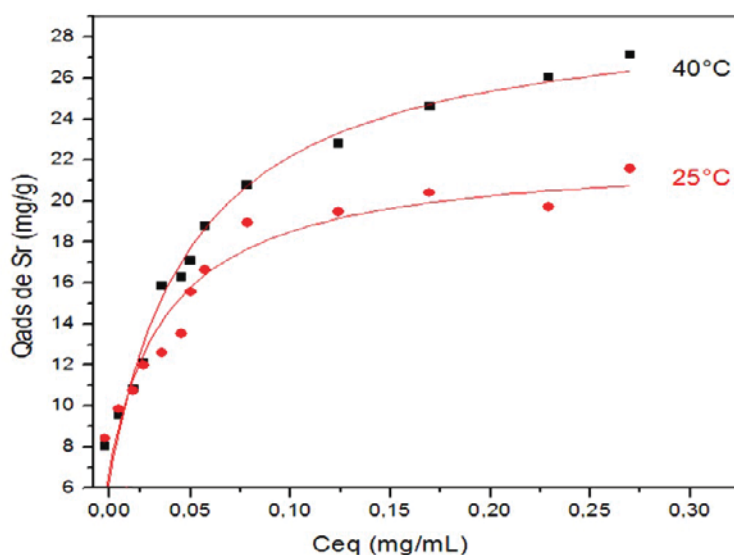
O aumento da temperatura causou um aumento na adsorção, concordando com os resultados de Saber-Samandari *et al.*, (2013) que trabalharam com compósitos de celulose-poliacrilamida-hidroxiapatita para remoção de íons cobre. Verificou-se a partir de quatro diferentes temperaturas (20°C, 30°C, 40°C e 45°C) que na temperatura mais elevada (45°C) obteve-se o maior valor de adsorção, explicando esse fenômeno como um processo endotérmico.

Teoricamente, a quantidade adsorvida decresce com o aumento da temperatura, pois, geralmente, os processos de adsorção são exotérmicos, o que sugere a ocorrência de outro fenômeno como permuta de cátions, onde está envolvido a troca iônica do cálcio encontrado na hidroxiapatita com o estrôncio adicionado por ensaio de adsorção em batelada.

5.4.1.4 Isoterma de adsorção

O modelo de Langmuir foi utilizado para ajustar os dados experimentais das isotermas, conforme se vê na Figura 30. A partir das isotermas, nota-se que a capacidade máxima de adsorção é diretamente proporcional ao aumento de temperatura.

Figura 30 - Isotermas de adsorção com ajuste ao modelo de Langmuir em temperaturas de 25°C e 40°C



Fonte: Elaborada pela autora.

Este perfil de isoterma é considerado como favorável a adsorção. O aumento da adsorção com o aumento da temperatura sugere que há uma transição de adsorção física para uma adsorção química e que uma provável variação de entropia tenha causado esse aumento.

Na Tabela 5 verificou-se que com o aumento de temperatura (40°C) o híbrido CB/CaHA/Sr adsorveu mais 7,49 mg de Sr por g de adsorvente, aproximadamente.

Tabela 5 - Parâmetros dos íons Sr obtidos pelo ajuste das isothermas à 25°C e 40°C

PARÂMETROS			
	$Q_{\max Sr}$ (mg/g)	K_{Sr} (L/mg)	R^2
CB/CaHA/Sr 25°C	22,42 ± 0,49	36,01 ± 2,77	0,98
CB/CaHA/Sr 40°C	29,91 ± 1,14	29,31 ± 3,44	0,96

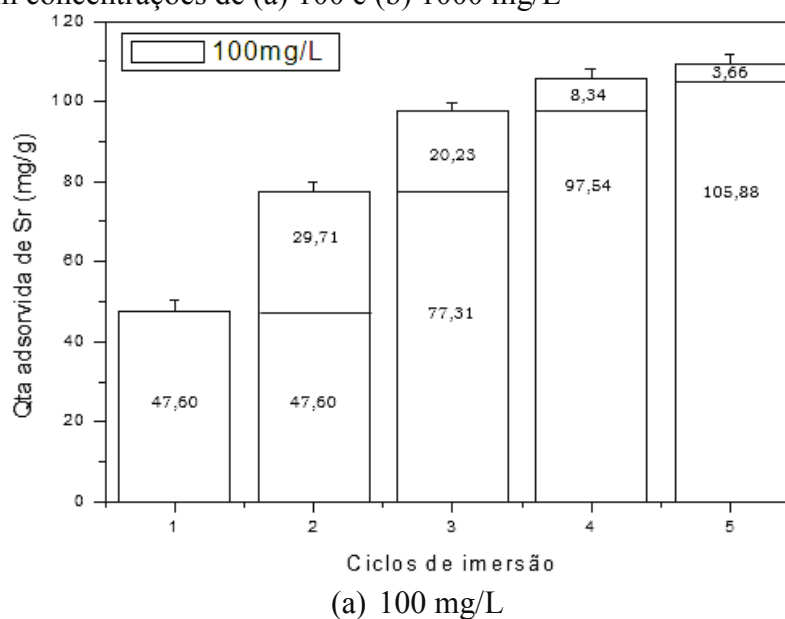
Fonte: Elaborada pela autora.

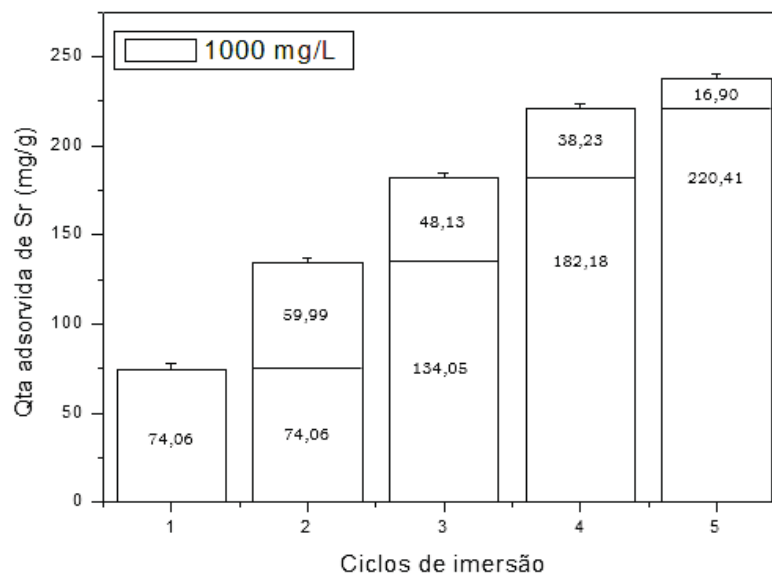
5.4.2 Análises realizadas com o biomaterial CB/SrAp

5.4.2.1 Adsorção de Sr nos ciclos de imersão

O biomaterial CB/SrAp foi obtido através da precipitação química de íons P e Sr com a formação de fosfatos de estrôncio sobre a superfície da CB. Essa forma de inserção de Sr o tornou mais fortemente ligada a superfície do material, pois ocorreu uma ligação iônica do metal a um não-metal. Dessa forma, a celulose que contém grupos hidroxilas (OH-) livres facilita a interação com o Sr^{2+} (carregado positivamente) formando uma ligação iônica entre eles e os íons fosfato (PO_4^{3-}), por sua vez, se ligaria ao Sr. Para este composto sugere-se que esteja ocorrendo várias interações conhecidas de forças intermoleculares. Sugere-se que sejam necessárias outras análises para confirmar essa interação como ressonância magnética ou espectrometria de massa ou EXAFs.

Figura 31 – Determinação de estrôncio a cada ciclo de imersão em concentrações de (a) 100 e (b) 1000 mg/L





(b) 1000 mg/L

Fonte: Elaborada pela autora.

A adsorção foi maior nos primeiros ciclos (FIGURA 31), devido a disponibilidade de sítios ativos. A formação de apatita de estrôncio foi comprovada devido à redução na concentração residual na solução de estrôncio.

Na concentração de 1000 mg/L foi observado uma maior incorporação, obtendo 237,32 mg/g do somatório de cada ciclo. Já na concentração de 100 mg/L foi alcançado apenas 109,54 mg/g de adsorvente. Com o decorrer dos ciclos houve uma redução na adsorção, podendo ser interpretada como ocupação dos sítios disponíveis. Esta etapa foi atrelada a formação da apatita por precipitação química com a síntese de fosfatos de estrôncio.

5.4.3 Análises realizadas com o híbrido CB/Sr

5.4.3.1 Influência de Sr na produção de CB

Como o estrôncio é um metal que pertence à família dos alcalinos terrosos, foi necessário avaliar sua influência na massa de CB produzida por *G. hansenii* (TABELA 6). Esse teste também foi feito para validar a metodologia de inserção do estrôncio no meio de cultivo dessa bactéria.

A adição do estrôncio ao meio cultivo sobre a síntese de CB causou um decréscimo de massa de CB produzida, quando comparada à da amostra controle (TABELA 6). A redução na massa de CB foi inversamente proporcional a concentração de Sr adicionada ao meio de cultivo, variando de 12% a 32% menores que a massa do controle. Esse resultado demonstrou que a adição desse metal durante a síntese de CB não é indicada.

Tabela 6 – Valores de massa de CB e porcentagem de rendimento com e sem a inserção do estrôncio no meio de cultivo.

<i>Amostras (mg/L de Sr)</i>	<i>Peso de CB (g)</i>	<i>Rendimento de CB (%)</i>	<i>Redução da massa (%)</i>
Controle*	0,6375	100	0
HS + 100	0,557	87,37	12,63
HS + 500	0,468	73,41	26,59
HS + 1000	0,429	67,29	32,71

* Na amostra controle não há adição de Sr no meio de cultivo HS.

Fonte: Elaborada pela autora.

A inserção do estrôncio durante o cultivo traz uma perda de massa em termos de rendimento caindo gradualmente com o aumento da concentração. Essa perda de massa pode ser atribuída a um possível efeito negativo na atividade microbiana causada pelo metal.

Para verificar se o Sr apresenta efeito antimicrobiano sobre o crescimento de *G. hansenii* é necessário a realização de mais estudos.

5.4.3.2 Teor de açúcar redutor

Para verificar o efeito da adição do estrôncio no meio de fermentação foi realizado a determinação de açúcares redutores. Esse teste indica a concentração de açúcar consumido pela bactéria.

Foi verificado que a perda de massa da produção de celulose bacteriana está relacionada com inserção do estrôncio no meio. O consumo normal da bactéria está em torno de 42 % do açúcar inicial presente no meio de cultivo, quando comparando com a incubação da bactéria na presença de estrôncio houve uma queda de consumo de açúcar para 23 %. Totalizando numa perda 18 % de conversão do açúcar para a produção de CB.

Tabela 7. Teores de açúcares redutores no meio de cultivo com e sem adição de Sr antes e após 6 dias de fermentação.

<i>Amostras</i>	<i>Concentração de Açúcar (g/L)</i>	<i>Consumo em %</i>
HS inicial	21,025	42,31±0,23
HS final	12,129	
HS/Sr inicial	20,453	23,57±0,15
HS/Sr final	15,633	

Fonte: Elaborada pela autora

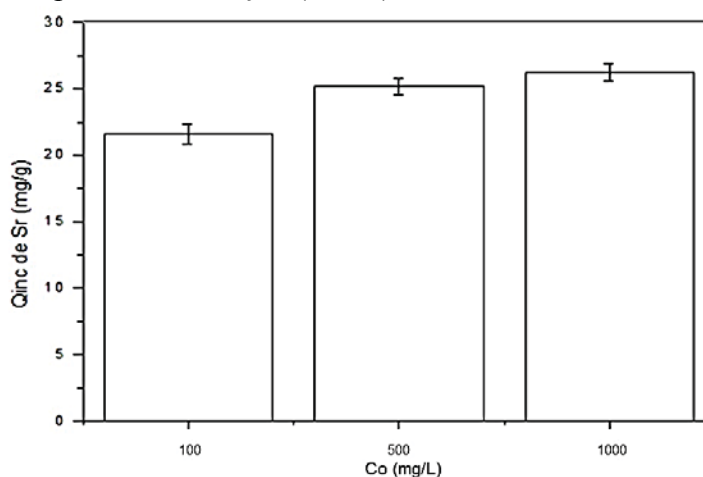
* Foi adicionado 100 mg/L de Sr.

5.4.3.3 Estrôncio incorporado na estrutura de CB por co-condensação

Após a fermentação (6 dias) foi determinado o teor de Sr residual para quantificar o estrôncio aprisionado na membrana de CB por co-condensação. O teste foi realizado com três concentrações diferentes 100, 500 e 1000 (mg/L) de Sr adicionados ao meio de cultivo.

Verificou-se que o estrôncio foi incorporado na película de CB e que houve um aumento na concentração de Sr presente na estrutura com o aumento da concentração inicial de Sr adicionado no meio de cultivo. Para as concentrações de 100, 500 e 1000 mg/L de Sr foram aprisionados cerca de 21,62; 25,17 e 26,25 mg de Sr por g de material, respectivamente.

Figura 32 – Quantificação de estrôncio aprisionado na CB após a fermentação (6 dias).



Fonte: Elaborada pela autora.

Nas concentrações de 500 mg/L e 1000 mg/L não houve diferença significativa nos teores de Sr aprisionado, indicando que 500 mg/L seja a quantidade máxima de incorporação que o material pode suportar.

5.5 Estudo de dessorção

O resultado dos testes de adsorção demonstrou que entre os materiais produzidos o que mais adsorveu foi o híbrido CB/SrAp com 237,31 mg/g, seguido do CB/CaHA/Sr com 29,91 mg/g e por último o CB/Sr com 26,25 mg/g (TABELA 8).

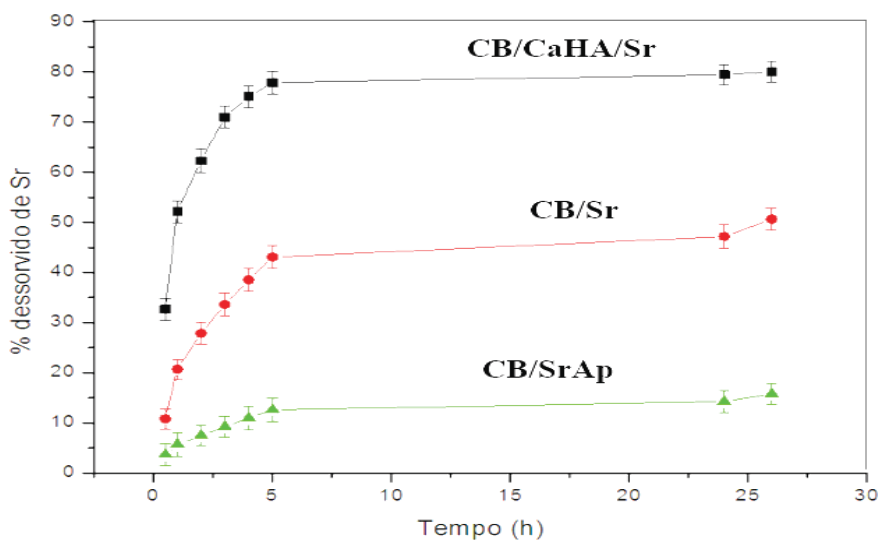
Tabela 8. Valores de adsorção de Sr para cada biomaterial produzido.

Biomateriais sintetizados		
<u>Adsorção de Sr (mg/g)</u>		
CB/CaHA/Sr	CB/SrAp	CB/Sr
$29,91 \pm 1,14$	$237,31 \pm 0,42$	$26,25 \pm 0,57$

Fonte: Elaborada pela autora.

No teste de eluição foi avaliado a capacidade dos biomateriais produzidos em liberar estrôncio adsorvido. O híbrido CB/CaHA/Sr, com apenas três horas de ensaio, já havia liberado 62,33% de estrôncio (FIGURA 33). Houve liberação rápida e, com 26 horas de ensaio, o CB/CaHA/Sr desorveu 80,08% do estrôncio.

Figura 33 - Dessorção de estrôncio dos biomateriais produzidos



Fonte: Elaborada pela autora.

O biomaterial CB/Sr iniciou a eluição após duas horas e liberando 27,85%, contudo, apresentou uma liberação mais lenta do que o CB/CaHA/Sr e ao final do teste, foi eluído 50,64% do total de estrôncio adsorvido. O CB/SrAp apresentou uma liberação mais lenta do que os demais materiais, nas primeiras duas horas eluiu 5,67% de Sr e com o passar do tempo permaneceu numa fase estacionária. Após 26 horas foi liberado apenas 15,76% de Sr.

O resultado de desorção do composto CB/SrAp mostrou-se interessante para o uso “in vivo” por ter sido o biomaterial que mais adsorveu estrôncio e sua liberação foi lenta, mantendo em torno de 85% do estrôncio ainda incorporado, possibilitando seu uso como carreador de fármacos com entrega controlada.

Cuppok *et al.* (2011), que estudaram os mecanismos de liberação de drogas, verificaram que para desempenhar uma maior eficácia terapêutica, diminuição da toxicidade e

REFERÊNCIAS

- AHN, Sung-jun et al. Characterization of hydroxyapatite-coated bacterial cellulose scaffold for bone tissue engineering. **Biotechnology And Bioprocess Engineering**, [s.l.], v. 20, n. 5, p.948-955, set. 2015. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s12257-015-0176-z>.
- ALBERTSSON, Ann-christine et al. Recent Developments in Ring Opening Polymerization of Lactones for Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, [s.l.], v. 4, n. 6, p.1466-1486, nov. 2003. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bm034247a>.
- ANDIA, Denise Carleto; CERRI, Paulo Sérgio; SPOLIDORIO, Luis Carlos. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da Unesp**, Araraquara, v. 2, n. 35, p.191-98, 2006.
- ATKINS P.; DE PAULA, J. **Físico-química**. Rio de Janeiro-RJ. Editora LTC, 8.ed., v.2, p. 322-330, 2008.
- BHATNAGAR, V. M.. Infrared spectrum of strontium hydroxyapatite. **Experientia**, [s.l.], v. 23, n. 9, p.697-699, set. 1967. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02154118>.
- BLAKE, Glen M; FOGELMAN, Ignac. Strontium ranelate: a novel treatment for postmenopausal osteoporosis. **Clinical Interventions In Aging**, [s.l.], v. 1, n. 4, p.367-375, dez. 2006. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/ciia.2006.1.4.367>.
- BOSE, Susmita et al. Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 31, n. 10, p.594-605, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.06.005>.
- BRUNAUER, Stephen; EMMETT, P. H.; TELLER, Edward. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **J. Am. Chem. Soc.**, [s.l.], v. 60, n. 2, p.309-319, fev. 1938. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja01269a023>.
- BUGARIN JÚNIOR, João Geraldo; GARRAFA, Volnei. Bioética e biossegurança: uso de biomateriais na prática odontológica. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], v. 41, n. 2, p.223-228, abr. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-89102007000200008>.
- CACICEDO, Maximiliano L. et al. Modified bacterial cellulose scaffolds for localized doxorubicin release in human colorectal HT-29 cells. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 140, p.421-429, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.007>.
- CASTELLAN, G. **Fundamentos de Físico-química**. Rio de Janeiro-RJ. Editora LTC 1. Ed, p. 460-463, 1986.
- CAUDRILLIER, A. et al. Strontium Ranelate Decreases Receptor Activator of Nuclear Factor- B Ligand-Induced Osteoclastic Differentiation In Vitro: Involvement of the Calcium-Sensing Receptor. **Molecular Pharmacology**, [s.l.], v. 78, n. 4, p.569-576, 28 jun. 2010. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/mol.109.063347>.

CAVALCANTE JR., C. L.; AZEVEDO, D. C. S. **Separação de Misturas por Adsorção: dos Fundamentos ao Procedimento em Escala Comercial**, Tese submetida a Concurso Público para Professor Titular do Departamento de Engenharia Química. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1998.

CHEN, Shiyang et al. Carboxymethylated-bacterial cellulose for copper and lead ion removal. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 161, n. 2-3, p.1355-1359, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.098>.

COSTA, L. S. Materiais híbridos mesoestruturados funcionalizados via co-condensação aplicados na sorção. Dissertação (Mestrado) – Curso de Química, UNICAMP, Campinas, 2012.

CUPPOK, Y. et al. Drug release mechanisms from Kollicoat SR: Eudragit NE coated pellets. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 409, n. 1-2, p.30-37, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.026>.

CZAJA, W et al. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.145-151, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.035>.

CZAJA, Wojciech K. et al. The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-12, jan. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bm060620d>.

DE ANGELIS, C. D.; SEGRE, A.; CRESCENZI, V. **Polymer Preparation**, p. 42-45, 2001.

DEEKS, Emma D. et al. Strontium Ranelate. **Drugs**, [s.l.], v. 70, n. 6, p.733-759, abr. 2010. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.2165/10481900-000000000-00000>.

DO, D.D. **Adsorption Analysis: Equilibria and Kinetics**, Series on Chemical Engineering, Vol. 2, Imperial College Press, London, 1998.

DUARTE, Eden B. et al. Production of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites from agroindustrial wastes. **Cellulose**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.3177-3187, 21 ago. 2015. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10570-015-0734-8>.

FROMIGUE, O. et al. Essential Role of Nuclear Factor of Activated T Cells (NFAT)-mediated Wnt Signaling in Osteoblast Differentiation Induced by Strontium Ranelate. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 285, n. 33, p.25251-25258, 16 jun. 2010. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.110502>.

GARG, A.K. Bone Physiology for dental implantology. In: GARG A.K. Bone Biology, harvesting, grafting for dental implants. Rationale and clinical applications. Quintessence Publishing, Nova Deli China, cap. 1, p. 3-19, 2004.

GEIGER, M. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 55, n. 12, p.1613-1629, 28 nov. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.010>.

GIROTRA, Monica; RUBIN, Mishaela R; BILEZIKIAN, John P. Anabolic Agents for Osteoporosis. **Treatments In Endocrinology**, [s.l.], v. 5, n. 6, p.347-358, 2006. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.2165/00024677-200605060-00003>.

GOMES, E. C. C. **Síntese e caracterização de esferas mesoporosa de sílica funcionalizadas com EDTA visando aplicação em adsorção de íons.** Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

GOMEZ-ROMERO, P.. Hybrid Organic-Inorganic Materials—In Search of Synergic Activity. **Adv. Mater.**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.163-174, fev. 2001. Wiley-Blackwell. [http://dx.doi.org/10.1002/1521-4095\(200102\)13:33.0.co;2-u](http://dx.doi.org/10.1002/1521-4095(200102)13:33.0.co;2-u).

GORBET, Maud B.; SEFTON, Michael V.. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. **Biomaterials**, [s.l.], v. 25, n. 26, p.5681-5703, nov. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.023>.

GRANDE, Cristian J. et al. Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.1605-1615, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.01.022>.

GUIZARD, Christian et al. Hybrid organic-inorganic membranes with specific transport properties. **Separation And Purification Technology**, [s.l.], v. 25, n. 1-3, p.167-180, out. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1383-5866\(01\)00101-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1383-5866(01)00101-0).

HALIB, N. *et al.* **Swelling of bacterial cellulose-acrylic acid hydrogels: Sensitivity towards external stimuli.** Sains Malaysiana, v. 38, n. 5, p. 785-791, 2009.

HAUL, R.. S. J. Gregg, K. S. W. Sing: Adsorption, Surface Area and Porosity. 2. Auflage, Academic Press, London 1982. 303 Seiten, Preis. **Berichte Der Bunsengesellschaft Für Physikalische Chemie**, [s.l.], v. 86, n. 10, p.957-957, out. 1982. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bbpc.19820861019>.

HELMUS, M. N.; TWEDEN, K. **Materials Selection.** In: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part A, v. 2, p.1429-1463, 1995

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M.. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochem. J.**, [s.l.], v. 58, n. 2, p.345-352, out. 1954. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj0580345>.

HILL, P. Bone remodelling. **British Journal Of Orthodontics**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.101-107, maio 1998. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1093/ortho/25.2.101>.

HOLZAPFEL, Boris Michael et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 65, n. 4, p.581-603, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.009>.

HUTCHENS, S et al. Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel. **Biomaterials**, [s.l.], v. 27, n. 26, p.4661-4670, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.04.032>.

IANNAZZO, D. et al. Drug delivery strategies for bone tissue regeneration. **OMICS Group ebooks**, 2015.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. **Tecido ósseo.** Histologia básica. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2004. p. 111-128

KARATAŞ, Sevim et al. Preparation and characterization of phosphine oxide containing organosilica hybrid coatings by photopolymerization and sol-gel process. **Progress In Organic Coatings**, [s.l.], v. 65, n. 1, p.49-55, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.porgcoat.2008.09.022>.

KOHLI, Sarvrajsingh; KOHLI, Virindersingh. Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. **Indian Journal Of Endocrinology And Metabolism**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.175-181, 2011. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/2230-8210.83401>.

KOKUBO, Tadashi; KIM, Hyun-min; KAWASHITA, Masakazu. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, [s.l.], v. 24, n. 13, p.2161-2175, jun. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00044-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00044-9).

LACERDA, K.A. **Obtenção de matrizes bioabsorvíveis à base de hidroxiapatita para aplicação em braquiterapia.** (Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações. Minerais e Materiais) Belo Horizonte: Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Comissão Nacional de Energia Nuclear, 2005.

LIMITED, S.L. **Summary of Product Characteristics Protelos 2 g granules for oral suspension**, in: The electronic Medicines Compendium (eMC) 2011.

LIU, y et al. Crosslinked organic-inorganic hybrid chitosan membranes for pervaporation dehydration of isopropanol-water mixtures with a long-term stability. **Journal Of Membrane Science**, [s.l.], v. 251, n. 1-2, p.233-238, 1 abr. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2004.12.003>.

MARIE, P. J.; FELSEMBERG, D.; BRANDI, M. L.. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. **Osteoporosis International**, [s.l.], v. 22, n. 6, p.1659-1667, 2 set. 2010. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-010-1369-0>.

MARIE, P.j. et al. Mechanisms of Action and Therapeutic Potential of Strontium in Bone. **Calcified Tissue International**, [s.l.], v. 69, n. 3, p.121-129, set. 2001. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s002230010055>.

MEI, L.H.I.; LEITE, R.C.; FELISBERTI, M.I. **Hidrogéis de poli(álcool vinílico): caracterização do grau de intumescimento e de reticulação para aplicação em liberação controlada de drogas**, III Congresso Brasileiro de Polímeros, p. 269-272, 1995.

MELNIKOV, Petr; GONÇALVES, Renato V.. Preparation and characterization of strontium hydroxyapatite $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ suitable for orthopedic applications. **Materials Letters**, [s.l.], v. 150, p.89-92, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2015.02.110>.

MONTEIRO, Raquel Almeida. **Avaliação do potencial de adsorção de U, Th, Pb, Zn e Ni pelas fibras de coco.** Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências na Área de Tecnologia e Ciências - Materiais, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2009.

MOREJÓN-ALONSO, Loreley et al. Effect of sterilization on the properties of CDHA-OCP-beta-TCP biomaterial. **Mat. Res.**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.15-20, mar. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-14392007000100005>.

NASCIMENTO, Ronaldo Ferreira et al. **Adsorção: Aspectos teóricos e aplicações**

ambientais. Fortaleza: Imprensa Universitária, 256 p, 2014.

NEJATI, E.; MIRZADEH, H.; ZANDI, M.. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite rods/poly(l-lactide acid) composite scaffolds for bone tissue engineering. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, [s.l.], v. 39, n. 10, p.1589-1596, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compositesa.2008.05.018>.

NISHIYAMA, Yuichi et al. Adsorption and removal of strontium in aqueous solution by synthetic hydroxyapatite. **Journal Of Radioanalytical And Nuclear Chemistry**, [s.l.], v. 307, n. 2, p.1279-1285, 20 jun. 2015. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10967-015-4228-9>.

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

PEREIRA, P. H. F.; SILVA, M. L. C. P. da. Estudo da adsorção de surfactante catiônico em uma matriz inorgânica preparada via óxido de nióbio. **Cerâmica**, [s.l.], v. 55, n. 335, p.312-317, set. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0366-69132009000300011>.

PIGOSSI, Suzane C. et al. Bacterial cellulose-hydroxyapatite composites with osteogenic growth peptide (OGP) or pentapeptide OGP on bone regeneration in critical-size calvarial defect model. **Journal Of Biomedical Materials Research Part A**, [s.l.], v. 103, n. 10, p.3397-3406, 7 jul. 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.35472>.

PINEDA, Luz Dary Carreno; MESA, Luis Alfonso Caicedo; HABERT, Alberto Claudio. Effect of culture and purification conditions on physico-chemical and transport properties in bacterial cellulose membranes. **Chemical Engineering Transactions**, [s.l.], v. 20, p.327-332, 2010. AIDIC: Italian Association of Chemical Engineering. <http://dx.doi.org/10.3303/CET1020055>.

PINTO, Elaine Ruzgus Pereira. **Estudo do sistema celulose bacteriana-poliuretana para a produção de novos compósitos**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

QUERIDO, William; ROSSI, Andre L.; FARINA, Marcos. The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches. **Micron**, [s.l.], v. 80, p.122-134, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2015.10.006>.

RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V.. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 99, n. 6, p.2491-2511, 11 fev. 2015. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-6426-3>.

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

REGINSTER, J.- et al. Strontium Ranelate in Osteoporosis. **Cpd**, [s.l.], v. 8, n. 21, p.1907-1916, 1 set. 2002. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612023393639>.

REHMAN, I; BONFIELD, W. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by

photo acoustic FTIR spectroscopy. **Journal Of Materials Science: Materials in Medicine**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-4, 1997. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1018570213546>.

REZNIKOV, Natalie; SHAHAR, Ron; WEINER, Steve. Three-dimensional structure of human lamellar bone: The presence of two different materials and new insights into the hierarchical organization. **Bone**, [s.l.], v. 59, p.93-104, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2013.10.023>.

RIZZOLI, R *et al.* **Osteoporosis International**, v. 20, p. 165-166, 2009.

RIZZOLI, René et al. Adverse drug reactions to osteoporosis treatments. **Expert Review Of Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 4, n. 5, p.593-604, set. 2011. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1586/ecp.11.42>.

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

RUBIRA, Adley F. et al. Morfologia de hidrogéis-ípn termo-sensíveis e ph-responsivos para aplicação como biomaterial na cultura de células. **Polímeros**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.105-110, jun. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-14282009000200006>.

RUTHVEN, D. M., "**Principles of Adsorption and Adsorption Processes**", John Wiley & Sons: New York, 1984.

RYAN, Alice S. et al. Regional bone mineral density after resistive training in young and older men and women. **Scand J Med Sci Sports**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.16-23, fev. 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0838.2003.00328.x>

SABER-SAMANDARI, Samaneh; SABER-SAMANDARI, Saeed; GAZI, Mustafa. Cellulose-graft-polyacrylamide/hydroxyapatite composite hydrogel with possible application in removal of Cu (II) ions. **Reactive And Functional Polymers**, [s.l.], v. 73, n. 11, p.1523-1530, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.07.007>.

SAEGUSA, T.. Organic-inorganic polymers hybrids. **Pure And Applied Chemistry**, [s.l.], v. 67, n. 12, p.1965-1970, 1 jan. 1995. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1351/pac199567121965>.

SAIBUATONG, Ong-ard; PHISALAPHONG, Muenduen. Novo aloe vera–bacterial cellulose composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 79, n. 2, p.455-460, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.039>.

SAKIYAMA-ELBERT, Se; HUBBELL, Ja. Functional Biomaterials: Design of Novel Biomaterials. **Annu. Rev. Mater. Res.**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.183-201, ago. 2001. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.matsci.31.1.183>.

SANCHEZ, Clément et al. Applications of hybrid organic–inorganic nanocomposites. **Journal Of Materials Chemistry**, [s.l.], v. 15, n. 35-36, p.3559-3592, 2005. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b509097k>.

SASKA S, SCARTEZINI GR, SOUZA RF, HOCHULI-VIEIRA E, PEREIRA FILHO VA, GABRIELLI MAC. Cloridrato de tramadol/paracetamol no controle da dor pós-operatória em cirurgias de terceiros molares inclusos. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial** p. 99-105, 2009.

- SATO, Michiko; WEBSTER, Thomas J. Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications. **Expert Review Of Medical Devices**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.105-114, set. 2004. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1586/17434440.1.1.105>.
- SCULLY, Crispian; MADRID, Carlos; BAGAN, Jose. Dental Endosseous Implants in Patients on Bisphosphonate Therapy. **Implant Dentistry**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.212-218, 2006. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/01.id.0000236120.22719.02>.
- SERVICE, R. F.. Tissue Engineers Build New Bone. **Science**, [s.l.], v. 289, n. 5484, p.1498-1500, 1 set. 2000. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.289.5484.1498>.
- SHACKELFORD, J. F. **Ciências dos Materiais**. Pearson Practice Hall, cap 1, 6 ed, 2008.
- SHI, Zhijun et al. In situ nano-assembly of bacterial cellulose–polyaniline composites. **Rsc Adv.**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.1040-1046, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c1ra00719j>.
- SILVÉRIO, Fabiano. **Preparação e Caracterização de Materiais Híbridos Formados pela Interação entre Hidróxidos Duplos Lamelares e Siliconas Aniônicas**. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- STEINBÜCHEL, A. ; DOI, Y. **Biotechnology of Biopolymers** Wiley-VCH Verlag, Weinheim, p. 381, 2005.
- TAKAHASHI, N et al. S 12911-2 Inhibits Osteoclastic Bone Resorption In Vitro. **J Bone Miner Res**, [s.l.], v. 18, n. 6, p.1082-1087, 1 jun. 2003. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.6.1082>.
- TENÓRIO, J.a.s; ESPINOSA, D.c.r. Treatment of chromium plating process effluents with ion exchange resins. **Waste Management**, [s.l.], v. 21, n. 7, p.637-642, jan. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0956-053x\(00\)00118-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0956-053x(00)00118-5).
- UHLIN, K. Ingegerd; ATALLA, Rajai H.; THOMPSON, Norman S.. Influence of hemicelluloses on the aggregation patterns of bacterial cellulose. **Cellulose**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.129-144, jun. 1995. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00816385>.
- VEGLIÒ, F.; ESPOSITO, A.; REVERBERI, A.p.. Standardisation of heavy metal biosorption tests: equilibrium and modelling study. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 38, n. 6, p.953-961, jan. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592\(02\)00235-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592(02)00235-2).
- VOLKMER, T. M.; SANTOS, L. A. dos. Influência do tempo de indução nas propriedades de hidroxiapatita porosa obtida por gelcasting de espumas. **Cerâmica**, [s.l.], v. 53, n. 328, p.429-435, dez. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0366-69132007000400015>.
- WAN, y et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites. **Composites Science And Technology**, [s.l.], v. 66, n. 11-12, p.1825-1832, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compscitech.2005.11.027>.
- WANG, Min et al. Adsorption and desorption of Sr(II) ions in the gels based on polysaccharide derivatives. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 171, n. 1-3, p.820-826, nov. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.071>.

YANG, Fan et al. Strontium Enhances Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and In Vivo Bone Formation by Activating Wnt/Catenin Signaling. **Stem Cells**, [s.l.], v. 29, n. 6, p.981-991, 23 maio 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/stem.646>.

ZENG, Xianfang; RUCKENSTEIN, Eli. Control of Pore Sizes in Macroporous Chitosan and Chitin Membranes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [s.l.], v. 35, n. 11, p.4169-4175, jan. 1996. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ie960270j>.

ZHANG, Yanzhong et al. Enhanced Biomineralization in Osteoblasts on a Novel Electrospun Biocomposite Nanofibrous Substrate of Hydroxyapatite/Collagen/Chitosan. **Tissue Engineering Part A**, [s.l.], v. 16, n. 6, p.1949-1960, jun. 2010. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0221>.

ZIMMERMANN, Kristen A. et al. Biomimetic design of a bacterial cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone healing applications. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.43-49, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2009.10.007>.