

BIOMATERIAL CONSTITUÍDO DE CELULOSE BACTERIANA E APATITA DE ESTRÔNCIO

GOMES, E. P. C. ¹, VIEIRA, R. S. ¹, PORTO, E. C. M. ¹, BORGES, M. F. ², ROSA, M. F. ²,
SANTANA, B. C. ²

¹ Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

² Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-Ceará

erikapatricia.gomes@alu.ufc.br

RESUMO – *O presente estudo propõe a obtenção de um biomaterial à base de celulose bacteriana combinado com apatita formada, predominantemente, por fosfatos de estrôncio. A celulose bacteriana (CB) foi obtida por um processo fermentativo da bactéria *Gluconacetobacter hansenii*. Essas películas de CB foram imersas em soluções de cloreto de estrôncio e fosfato de sódio dibásico, por ciclos de imersão, correspondendo a etapa de formação da hidroxiapatita de estrôncio. O biomaterial foi avaliado quanto à quantidade de estrôncio (Sr) adsorvida a cada ciclo de imersão e quanto ao perfil de eluição desse metal. Os resultados mostraram que o material é capaz de adsorver 237,32 mg de Sr por g do adsorvente ao final de cinco ciclos de imersão. Já o perfil de dessorção apresentou uma liberação mais lenta do metal, com apenas 15,76% de Sr dessorvido, em 26 horas. Conclui-se que o biomaterial consegue adsorver Sr em sua estrutura e sugere que o processo de eluição do Sr foi lento devido à ligação forte formada entre o adsorbato e a superfície do adsorvente.*

1. INTRODUÇÃO

Quem trabalha com biomateriais está numa busca incessante da combinação que faça a otimização das propriedades dos materiais de origem para que o material obtido sirva como substituinte de algum tecido danificado do organismo humano (Oréfice *et al.*, 2006). O foco deste trabalho está no desenvolvimento de um biomaterial visando aplicações biomédicas no tecido ósseo.

É feita uma combinação entre duas grandes classes dos biomateriais: os materiais poliméricos com os materiais cerâmicos, mais especificamente, são utilizados celulose bacteriana (CB) que é biopolímero de excelentes propriedades mecânicas, comparado a celulose vegetal, alta cristalinidade, biocompatibilidade e alta capacidade de retenção de água, também é livre de lignina e 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). Fazendo uma combinação com a apatita (Ap) que 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). 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). 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. Dessa combinação é obtido um material híbrido, possuindo uma fase orgânica (CB) e fase inorgânica (HA).

Os compósitos produzidos a partir de celulose bacteriana e hidroxiapatita têm sido direcionados para aplicação em engenharia de tecidos ósseos, pois a interação desses dois tipos de materiais têm favorecido a reparação óssea por apresentar características como elevadas propriedades mecânica, biocompatibilidade e biodegradabilidade ajustável, além de ter estabilidade em solução e ser excelente na adsorção de proteínas (Duarte *et al.*, 2015).

Além de sintetizar o híbrido é realizado a introdução do estrôncio (Sr) no material, pois tem como intuito potencializar os benefícios que a interação CB e HA possui e contribuir para os mecanismos de remodelação óssea. Esse metal tem despertado interesse em razão em de apresentar uma relação direta com a qualidade dos ossos. Estudos pré-clínicos demonstram os mecanismos de ação do estrôncio sobre o metabolismo ósseo e comprovam sua atuação como inibidor da reabsorção óssea, reduzindo a atividade dos osteoclastos (Caudrillier *et al.*, 2010), e também indutor na formação óssea, estimulando a atividade dos osteoblastos (Marie *et al.*, 2011). Sua dupla ação vem despertando um grande interesse nas pesquisas devido sua semelhança química com o cálcio e o surgimento do ranelato de estrôncio que é um fármaco utilizado no tratamento da osteoporose (Querido *et al.*, 2016).

Portanto, neste trabalho foi desenvolvido um biomaterial funcionalizado com estrôncio em matrizes de celulose bacteriana/apatita para avaliar a adsorção e a dessorção desse metal, de modo a potencializar a interação CB e Ap, no benefício do tecido ósseo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultivo do microrganismo

O cultivo foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da EMBRAPA Agroindústria Tropical. Foram utilizadas cepas de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 adquiridas da Coleção de Culturas da Fundação André Tosello, Campinas-SP. 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 -80°C.

2.2. Síntese do biomaterial celulose bacteriana e apatita de estrôncio (CB/SrAp)

O biomaterial foi produzido com o cultivo da cepa bacteriana em tubos contendo caldo HS com adição de 5% (v/v) de inóculo e incubados à 30°C/6 dias. A bactéria produziu uma película de celulose, a partir de um processo fermentativo. Em seguida, foi removido o meio de cultivo e essa película foi esterilizada em autoclave e submetida à purificação segundo a metodologia de

Pineda *et al.* (2010). O material híbrido foi obtido utilizando-se o método proposto por Hutchens *et al.* (2006), adaptado. Foram realizados 5 ciclos de imersão para causar a precipitação química e formação da apatita de estrôncio sobre a CB. O esquema reacional desse processo está representado na Figura 1.

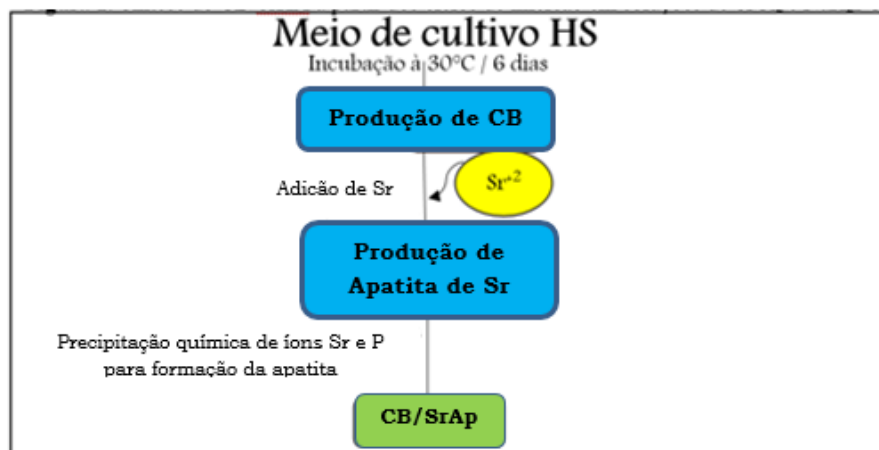


Figura 1- Síntese do CB/SrAp.

2.4. Método analítico

Soluções de Sr foram analisadas por Espectrometria de Absorção Atômica (AAS), em um comprimento de onda de 460 nm, que corresponde ao estrôncio. Foram utilizadas lâmpadas de cátodo ôco de Sr, acetileno como gás combustível e ar como gás suporte. Os valores fornecidos pelo espectrofotômetro estão em absorbância, por isso, foi plotado uma curva-padrão feita de solução padrão de Sr para a identificação das concentrações nas amostras. Na amostra analisada foi necessário adicionar o supressor KCl e o removedor de interferentes, lantânio, para aumentar a sensibilidade do equipamento, devido a utilização do gás ar-acetileno.

2.5. 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.

2.6. Estudo de dessorção

Para avaliar a quantidade de estrôncio que pode ser dessorvido do material sintetizado, foram realizados ensaios com tampão fosfato salino de pH 7,4 a 37°C sob agitação, 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 AAS para quantificação de estrôncio dessorvido.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cultivo do microrganismo

A formação de CB se inicia no terceiro dia de incubação, porém, com fina espessura e baixa resistência. Por isso, é necessário deixá-la durante 6 dias na incubadora (BOD) à 30°C para garantir que o polímero apresente fibras com resistência mecânica, como mostra a figura 2.

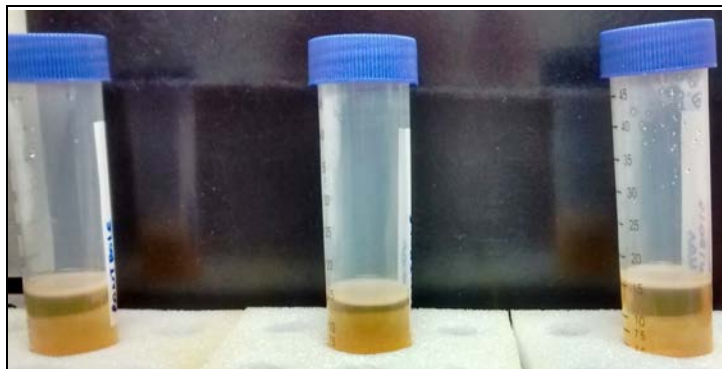


Figura 2 - Celulose bacteriana, em meio de cultivo HS, com seis dias de incubação.

3.2. Síntese do biomaterial celulose bacteriana e apatita de estrôncio (CB/SrAp)

A associação da celulose bacteriana com a apatita possibilitou obtenção de um material que visa mimetizar o osso humano, pois a apatita apresenta propriedades de biocompatibilidade e osseointegração. Já a utilização da celulose bacteriana é adequada devido a sua biocompatibilidade, relativa flexibilidade, alta pureza (quando comparada com a celulose vegetal), o que proporciona propriedades interessantes para utilização como um biomaterial.

A Figura 3 mostra o material híbrido sintetizado CB/SrAp. Neste trabalho foi sintetizado um biomaterial, visando obter um híbrido com uma quantidade considerável de estrôncio em sua estrutura, visando à utilização desse material em aplicações de osseointegração.

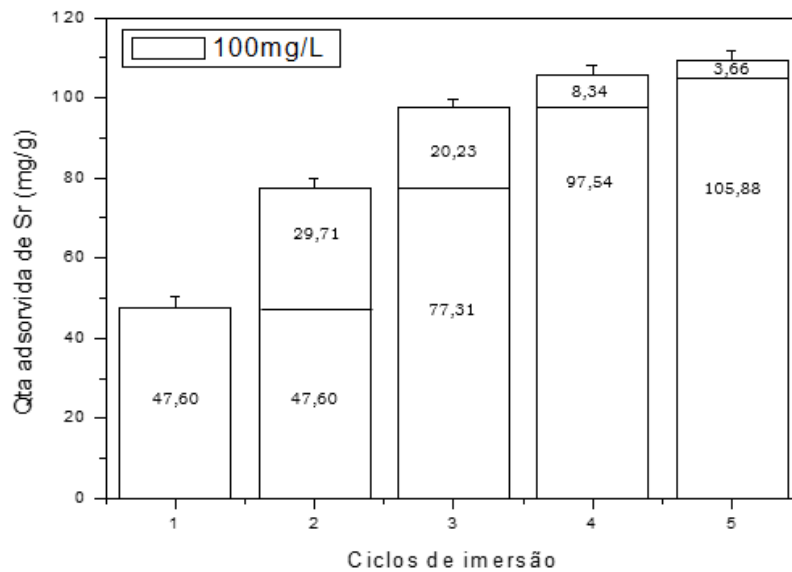


Figura 3 - Biomaterial dopado de estrôncio (CB/SrAp).

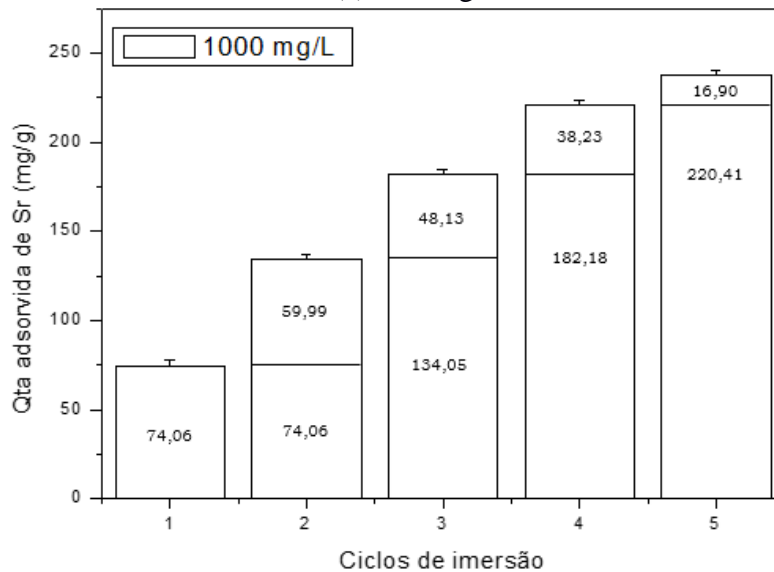
2.3. Quantificação de estrôncio a partir dos ciclos de imersão

Na Figura 4 tem-se que a adsorção é maior nos primeiros ciclos, devido a disponibilidade de sítios ativos. A formação de hidroxiapatita de estrôncio pode ser observado devido à redução de estrôncio na concentração residual.

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



(a) 100 mg/L



(b) 1000 mg/L

Figura 4 – Determinação de estrôncio a cada ciclo de imersão em concentrações de (a) 100 e (b) 1000 mg/L.

Sugere-se que a adsorção que está ocorrendo nesse ensaio é uma ligação iônica, pois o adsorbato liga-se a superfície do adsorvente através de uma ligação forte, havendo, predominantemente, a formação de fosfatos de estrôncio.

3.4. Estudo de dessorção

No teste de eluição foi avaliado a capacidade do biomaterial produzido em liberar estrôncio adsorvido. Na Figura 5 pode-se constatar que o CB/SrAp mostrou ter uma liberação mais lenta. Com trinta minutos de dessorção o material liberou 3,62% de Sr, com uma hora liberou mais 2,04% de Sr. De 2 horas até 24 horas o perfil de eluição encontrava-se numa fase estacionária liberando em torno de 1,8%. Completado às 26 horas foi contabilizado a liberação de apenas 15,76% de Sr.

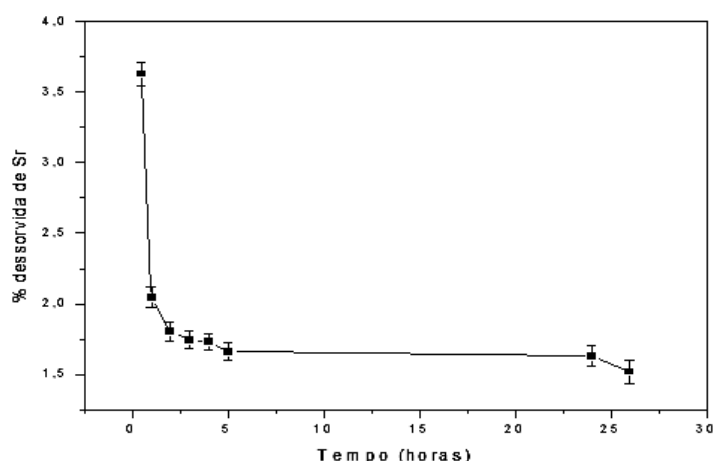


Figura 5 – Perfil de dessorção de Sr do material produzido (CB/SrAp).

O resultado de dessorção do composto CB/SrAp mostra-se interessante para o uso *in vivo*. Além de ter sido capaz de adsorver elevada quantidade de estrôncio, realizou uma liberação lenta do metal durante às 26 horas de ensaio, mantendo em torno de 85% do estrôncio ainda incorporado em sua estrutura, demonstrando uma liberação controlada de Sr, tornando-o um material promissor no uso como carreador de fármacos.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho verificou-se que o biomaterial produzido é capaz de adsorver íons Sr^{2+} em solução. O teste de dessorção indica que o biomaterial CB/SrHA libera estrôncio de forma controlada. Esse comportamento pode ser atribuído a interação forte entre o metal e a superfície do material, mostrando-se um material promissor para entrega de fármacos.

5. REFERÊNCIAS



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

AHN, SUNG-JUN, *et al.* "Characterization of hydroxyapatite-coated bacterial cellulose scaffold for bone tissue engineering." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 20(5), p.948-955, 2015.

CAUDRILLIER, A.; HURTEL-LEMAIRE, A. S.; WATTEL, A.; COURNARIE, F.; GODIN, C.; PETIT, L.; PETIT, J. P.; TERWILLIGER, E.; KAMEL, S.; BROWN, E. M.; MENTAVERRI, R.; BRAZIER, M. Strontium ranelate decreases receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-induced osteoclastic differentiation in vitro: involvement of the calcium-sensing receptor. *Mol. Pharmacol.*, v. 78, n. 4, p. 569-576, 2010.

DUARTE, E. B.; BRUNA, S. C.; ANDRADE, F. K.; BRÍGIDA, A. I. S.; BORGES, M. F.; MUNIZ, C. R.; FILHO, M. S. M.; MORAIS, J. P. S.; FEITOSA, J. P. A.; ROSA, M. F. Production of hydroxyapatite-bacterial cellulose nanocomposites from agroindustrial wastes. *Cellulose*, v. 22, n. 5, p. 3177-3187, 2015.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem. J.*, v. 58, n. 2, p. 345-352, 1954.

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

KOKUBO, T.; KIM, H.-M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, v. 24, p. 2161-2175, 2003.

MARIE, P. J.; FELSEBERG, D.; BRANDI, M. L. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. *Osteoporos Int.*, v. 22, n. 6, p. 1659-1667, 2011.

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

PIGOSSI, S. C.; DE OLIVEIRA, G. J.; FINOTI, L. S.; NEPOMUCENO, R.; SPOLIDORIO, L. C.; ROSSA, C. JR., RIBEIRO, S. J.; SASKA, S.; SCAREL-CAMINAGA, R. M. Bacterial cellulose-hydroxyapatite composites with osteogenic growth peptide (OGP) or pentapeptide OGP on bone regeneration in critical-size calvarial defect model. *J. Biomed. Mater. Res. A*, v. 103, n. 10, p. 3397-3406, 2015.

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

QUERIDO, W.; ROSSI, A. L.; FARINA, M. The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches. *Micron*, v. 80, p. 122-134, 2016.

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 99, n. 6, p. 2491-2511, 2015.

SATO, M; WEBSTER, T. J. Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications. *Expert Rev. Med. Devices*, v. 1, n. 1, p. 105-114, 2004.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO

