



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

**ANA LORENA DE BRITO SOARES**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS HÍBRIDOS À BASE DE CELULOSE E  
APATITA DE ESTRÔNCIO VOLTADOS À RECONSTRUÇÃO ÓSSEA**

**FORTALEZA**

**2021**

ANA LORENA DE BRITO SOARES

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS HÍBRIDOS A BASE DE CELULOSE E  
APATITA DE ESTRÔNCIO VOLTADOS À RECONSTRUÇÃO ÓSSEA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Fábiana Karine Andrade

**FORTALEZA**

**2021**

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)

---

S652d Soares, Ana Lorena de Brito.  
DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS HÍBRIDOS À BASE DE CELULOSE E APATITA DE  
ESTRÔNCIO VOLTADOS À RECONSTRUÇÃO ÓSSEA / Ana Lorena de Brito Soares. – 2021.  
75 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira.

Coorientação: Profa. Dra. Fábيا Karine Andrade.

1. Acetato de celulose. 2. Celulose Bacteriana. 3. Biomaterial. 4. Apatita de Estrôncio. 5. Método biomimético. I. Título.

CDD 660

---

ANA LORENA DE BRITO SOARES

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS HÍBRIDOS A BASE DE CELULOSE E  
APATITA DE ESTRÔNCIO VOLTADOS À RECONSTRUÇÃO ÓSSEA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 08/06/2021

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Fábila Karine Andrade  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Valdeez Ponte Rocha  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Niédja Fittipaldi Vasconcelos  
Centro Estratégico de Tecnologia do Nordeste (CETENE)

*A Deus.*

*À minha família e amigos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a força necessária para percorrer esse árduo caminho.

Aos meus pais, Joana Darc de Brito Soares e José Soares Filho, e meu irmão, Kauan Guilherme de Brito Soares, por serem meus pilares, por sempre estarem presentes, por me passarem amor e segurança, e sempre confiarem no meu potencial, até quando eu mesma desacreditava.

Aos meus familiares por todo o apoio e confiança, em especial aos meus tios, Roberto e Jacqueline (Jack), por terem me acolhido em seu lar durante esse período e por todas as conversas e experiências trocadas.

Ao meu tio, que carinhosamente chamávamos de Betinho (*in memoriam*), e à dona Neuza (*in memoriam*), os quais torciam pelo meu sucesso, mas infelizmente não puderam acompanhar essa vitória por conta da COVID-19.

Ao meu orientador, prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira, e à minha coorientadora, prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fábيا Karine Andrade, por todo o conhecimento repassado e pelo incentivo e apoio necessários à concretização desse trabalho.

Ao prof. Dr. Francisco Wilton Miranda da Silva, meu orientador nos cursos de graduação em Ciência e Tecnologia e em Engenharia Química na UFERSA, por ter dado todo o apoio à construção de meu currículo acadêmico.

À Dr.<sup>a</sup> Érika Patrícia por todas as experiências compartilhadas e pelos conhecimentos repassados.

Aos amigos e companheiros de pesquisa, Thamyres, Fábio, Sandy, Rubens, Lana e Niedja, por todo apoio, conversas e trocas de experiências.

Ao prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila e à prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marisa Masumi Beppu pelo apoio técnico fornecido durante os meses que trabalhei em minha pesquisa na UNICAMP.

Ao Dr. João de Deus pela amizade, pelos conhecimentos divididos e pela construção de uma grande parceria.

Às amigas que fiz no Laboratório de Biopolímeros e Impressão 3D, Jéssica Heline e Ingri Mancilla, pela amizade e por terem me proporcionado momentos incríveis.

Ao Grupo de Pesquisa em Separações por Adsorção (GPSA), em nome de Andréa Prudente, Janelene Eloi, Amanda Gomes e Caroline Rodrigues.

Aos amigos do tempo de graduação na UFERSA que sempre estiveram ao meu lado, Jonas Rodrigues, João Vitor, Teresa Raquel, Yago Neco, Lucas Marques, Vitória Penha, Yedna Maria, Esterfny Juliana, Fernandes Costa, Raimundo Júnior, Maria Neudna, Brenda Arruda e Thaianne Cruz.

*“It is impossible to live without failing at something, unless you live so cautiously that you might as well not have lived at all - in which case, you fail by default.”*

*J. K. Rowling*



## RESUMO

Problemas ósseos, tais como malformações congênitas, acidentes, tumores e osteoporose, estão se tornando cada vez mais comuns. A substituição de membros comprometidos por implantes é uma forma de tratamento muito utilizada. Materiais comumente empregados nessa área são facilmente suscetíveis à rejeição imunológica e complicações adicionais por tratar-se de metais ou ligas metálicas. Com o intuito de mimetizar a estrutura do tecido ósseo e, conseqüentemente, driblar esse problema, os biomateriais híbridos, compostos por uma parte orgânica e uma inorgânica, apresentam-se como fortes concorrentes a substituir os implantes tradicionais. O que se espera desses materiais, é que apresentem características como: biocompatibilidade; bioatividade, estimulando as células que compõem esse tecido a produzirem um novo tecido; e biodegradabilidade, não necessitando de procedimentos adicionais para remoção de material implantado. Diante desse contexto, o presente trabalho propõe obter novos biomateriais híbridos compostos por membranas porosas de acetato de celulose (AC), celulose bacteriana (CB) e celulose bacteriana oxidada (CBO) incorporadas com apatita de estrôncio (SrAp) através do método biomimético. Esse método consiste em utilizar uma solução de fluido corporal simulado (SBF) modificada com íons de estrôncio ( $Sr^{2+}$ ). A incorporação de SrAp nas membranas foi avaliada quimicamente por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia dispersiva de energia (EDS). O  $Sr^{2+}$  incorporado nas membranas foi quantificado por espectrometria de absorção atômica (AAS), onde é possível observar que a concentração de  $Sr^{2+}$  adsorvida pelas membranas estudadas não apresenta diferenças significativas ao decorrer dos dias. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstra uma deformação na estrutura das membranas após a modificação com SrAp. A difração de raios X (DRX) mostra que as membranas modificadas com SrAp apresentaram diminuição em sua cristalinidade. As amostras também foram avaliadas quanto ao seu grau de intumescimento, apresentando alta hidrofiliabilidade das membranas de AC, CB e CBO. A viabilidade celular foi estudada com células de osteoblastos de camundongo (MC3T3-E1 Subclone 14) e células de fibroblastos de camundongo (L-929), demonstrando que a biomineralização dos materiais com SrAp favoreceu a viabilidade celular desses materiais. A partir desses resultados, pode-se identificar que a celulose bacteriana oxidada biomineralizada com SrAp pelo método biomimético mostrou-se ser o material mais promissor a ser utilizado na regeneração de tecidos ósseos.

**Palavras-chave:** Acetato de celulose; Celulose Bacteriana; Biomaterial; Apatita de Estrôncio; Método biomimético.

## ABSTRACT

Bone problems, such as congenital malformations, accidents, tumors and osteoporosis, are becoming very common. Replacing compromised limbs with implants is a widely used form of treatment. Materials commonly used in this area are easily susceptible to immunological rejection and additional complications because they are metals or metal alloys. To mimic the structure of bone tissue and, consequently, overcome this problem, hybrid biomaterials, composed of an organic and an inorganic part, present themselves as strong competitors to replace traditional implants. What is expected of these materials is that they present characteristics such as: biocompatibility; bioactivity, stimulating the cells that are part of this tissue to produce new tissue; and biodegradability, not requiring additional procedures to remove implanted material. In this context, the present work proposes to obtain new hybrid biomaterials composed of porous membranes of cellulose acetate (CA), bacterial cellulose (BC) and oxidized bacterial cellulose (OBC) incorporated with strontium apatite (SrAp) through the biomimetic method. This method consists of using a simulated body fluid (SBF) solution modified with strontium ions ( $\text{Sr}^{2+}$ ). The incorporation of SrAp into membranes was chemically evaluated by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and energy dispersive spectroscopy (EDS). The  $\text{Sr}^{2+}$  incorporated in the membranes was quantified by atomic absorption spectrometry (AAS), where it is possible to observe that the concentration of  $\text{Sr}^{2+}$  adsorbed by the membranes studied does not present significant differences over the days. Scanning electron microscopy (SEM) demonstrates a deformation in the membrane structure after modification with SrAp. X-ray diffraction (XRD) shows that membranes modified with SrAp showed a decrease in their crystallinity. The samples were also evaluated for their degree of swelling, showing high hydrophilicity of CA, BC and OBC membranes. Cell viability was studied with mouse osteoblast cells (MC3T3-E1 Subclone 14) and mouse fibroblast cells (L-929), demonstrating that the membrane biomineralization with SrAp favored the cell viability of these materials. From these results, it can be identified that oxidized bacterial cellulose biomineralized with SrAp by the biomimetic method proved to be the most promising material to be used in the regeneration of bone tissue.

**Keywords:** Cellulose Acetate; Bacterial Cellulose; Biomaterial; Strontium Apatite; Biomimetic method.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação dos biomateriais quanto ao tipo de material. ....	22
Figura 2 – Estrutura tridimensional do osso. ....	23
Figura 3 – Estrutura química da celulose. ....	26
Figura 4 – Mecanismo de reação de oxidação da celulose com periodato ( $\text{IO}_4^-$ ) catalisada por meio ácido. ....	28
Figura 5 – Estrutura química do Acetato de Celulose (AC). ....	29
Figura 6 – Estrutura molecular da Apatita de Estrôncio (SrAp). ....	30
Figura 7 – Diâmetro das membranas de celulose bacteriana (CB) antes (a) e após (b) sua oxidação com periodato de sódio. ....	40
Figura 8 – Vista superior da membrana de acetato de celulose (AC). ....	41
Figura 9 – Grau de intumescimento e bioatividade in vitro das membranas de celulose bacteriana (CB), celulose bacteriana oxidada (CBO) e acetato de celulose (AC) em água e SBF, respectivamente. ....	42
Figura 10 – Micrografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies de AC (a.1. e a.2.), AC7dSrAp (b.1. e b.2.) e AC14dSrAp (c.1. e c.2.) e suas respectivas espectroscopias por energia dispersiva (EDS). ....	46
Figura 11 – Distribuição de diâmetro de poros das membranas de AC, AC7dSrAp e AC14dSrAp, e suas respectivas curvas de distribuição normal. ....	47
Figura 12 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies de CB (a.1. e a.2.), CB7dSrAp (b.1. e b.2.) e CB14dSrAp (c.1. e c.2.) e suas respectivas espectroscopias por energia dispersiva (EDS). ....	49
Figura 13 – Distribuição de diâmetro de fibras das membranas de CB, CB7dSrAp e CB14dSrAp, e suas respectivas curvas de distribuição normal. ....	50
Figura 14 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies de CBO (a.1. e a.2.), CBO7dSrAp (b.1. e b.2.) e CBO14dSrAp (c.1. e c.2.) e suas respectivas espectroscopias por energia dispersiva (EDS). ....	52
Figura 15 - Distribuição de diâmetro de fibras das membranas de CBO, CBO7dSrAp e CBO14dSrAp, e suas respectivas curvas de distribuição normal. ....	53
Figura 16 – Padrões de difração de raios X das membranas de acetato de celulose (AC), celulose bacteriana (CB) e celulose bacteriana oxidada (CBO), antes e após a imersão em m-SBF por 7 dias. ....	54

Figura 17 – Espectros de FTIR das membranas de acetato de celulose (AC), celulose bacteriana (CB) e celulose bacteriana oxidada (CBO), antes e após imobilização de SrAp. ....	56
Figura 18 – Citotoxicidade das membranas de acetato de celulose (AC), celulose bacteriana (CB) e celulose bacteriana oxidada (CBO), antes e após a mineralização de SrAp, em contato com fibroblastos de camundongo (L-929) após 24h e 48h. ....	59
Figura 19 – Citotoxicidade das membranas de acetato de celulose (AC), celulose bacteriana (CB) e celulose bacteriana oxidada (CBO), antes e após a mineralização de SrAp, em contato com osteoblastos de camundongo (MC3T3-E1 Subclone 14) após 24h e 48h. ....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Módulo de Young para diferentes materiais.....	24
Tabela 2 – Composição do fluido corporal simulado (SBF).....	35
Tabela 3 – Membranas obtidas após o processo de biomineralização de SrAp.....	36
Tabela 4 – Tempo e grau de intumescimento das membranas de acetato de celulose (AC), celulose bacteriana (CB) e celulose bacteriana oxidada (CBO) no equilíbrio. ....	43
Tabela 5. Incorporação de Sr em membranas de acetato de celulose (AC), celulose bacteriana (CB) e celulose bacteriana oxidada (CBO). ....	44
Tabela 6 – Posições dos modos vibracionais dos espectros de FTIR referentes às membranas de acetato de celulose (AC), celulose bacteriana (CB) e celulose bacteriana oxidada (CBO), antes e após mineralização de SrAp. ....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AAS</b>	Espectrometria de Absorção Atômica
<b>Abs</b>	Absorbância
<b>AC</b>	Acetato de Celulose
<b>Ap</b>	Apatita
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATR</b>	Refletância Total Atenuada
<b>CB</b>	Celulose Bacteriana
<b>CBO</b>	Celulose Bacteriana Oxidada
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DRX</b>	Difração de Raios X
<b>EDS</b>	Espectroscopia Dispersiva de Energia
<b>EMBRAPA</b>	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<b>FBS</b>	Soro Fetal Bovino
<b>FTIR</b>	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
<b>HA</b>	Hidroxiapatita
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>HS</b>	Hestrin & Schramm
<b>ICr</b>	Índice de Cristalinidade
<b>ISO</b>	Organização Internacional de Normalização
<b>LANAGUA</b>	Laboratório Núcleo de Águas
<b>m</b>	Massa
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>M<sub>M</sub></b>	Massa Molar
<b>m-SBF</b>	Fluido Corporal Simulado Modificado com Sr <sup>2+</sup>
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato-Salino
<b>PCL</b>	Policaprolactona
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>Qads</b>	Quantidade Adsorvida
<b>rpm</b>	Rotações por Minuto
<b>SBF</b>	Fluido Corporal Simulado
<b>SrAp</b>	Apatita de Estrôncio

<b>SrR</b>	Ranelato de Estrôncio
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>v</b>	Volume
<b>vs</b>	Versus

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\delta$	Deformação
®	Marca registrada
$\mu\text{m}$	Micrômetros
Å	Ångström
Ca	Cálcio
cm	Centímetros
g	Gramas
h	Horas
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
nm	Nanômetro
°C	Graus Célsius
Sr	Estrôncio
Ta	Tântalo
Ti	Titânio
$\lambda$	Comprimento de onda
v	Estiramento



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	21
2.1. Biomateriais.....	21
2.2. Tecido ósseo .....	22
2.3. Celulose .....	25
2.4. Estrôncio .....	29
3. OBJETIVOS .....	31
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos .....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. Materiais .....	32
4.2. Métodos.....	32
4.2.1. <i>Produção de membranas de Celulose Bacteriana (CB)</i> .....	32
4.2.2. <i>Oxidação da Celulose Bacteriana (CBO)</i> .....	33
4.2.3. <i>Produção de membranas de Acetato de Celulose (AC)</i> .....	33
4.3. Técnicas de Caracterizações .....	34
4.3.1. <i>Grau de intumescimento e Bioatividade in vitro</i> .....	34
4.3.2. <i>Biomíneralização de SrAp</i> .....	34
4.3.3. <i>Microscopia Eletrônica de Varredura - Espectroscopia por Energia Dispersiva (MEV-EDS)</i> .....	37
4.3.4. <i>Difração de raios X (DRX)</i> .....	37
4.3.5. <i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	38
4.3.6. <i>Ensaio de citotoxicidade in vitro</i> .....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	40
5.1. Membranas produzidas.....	40

<b>5.2. Grau de intumescimento e Bioatividade <i>in vitro</i></b> .....	41
<b>5.3. Incorporação de SrAp</b> .....	44
<b>5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura - Espectroscopia por Energia Dispersiva (MEV-EDS)</b> .....	45
<b>5.5. Difração de raios X (DRX)</b> .....	54
<b>5.6. Espectroscopia com absorção na região infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	55
<b>5.7. Ensaio de citotoxicidade</b> .....	58
<b>6. RESUMO DOS RESULTADOS</b> .....	62
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	64
<b>8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	65
<b>9. TRABALHOS PUBLICADOS E EM PRODUÇÃO</b> .....	66
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	67

## 1. INTRODUÇÃO

Problemas ósseos mostram-se a cada dia mais comuns, inclusive, pesquisas na área apontam que, com o aumento na idade média da população houve também um aumento constante no número de casos associados a essas questões (BLACK *et al.*, 2015). Dentre os vários causadores desse problema, pode-se citar as falhas na estrutura óssea provenientes das malformações congênitas, acidentes, tumores e osteoporose. Com base nos diversos problemas relacionados à defeitos presentes na estrutura óssea, os enxertos e implantes ósseos surgem como uma alternativa ao seu tratamento (HU *et al.*, 2019). Os enxertos ósseos são materiais ósseos que são retirados de outros locais do corpo para serem implantados no local que necessita desse reparo, já o implante, é um material produzido para substituir partes danificadas da estrutura óssea. Alguns materiais comumente utilizados com a finalidade de reparar ou substituir defeitos ósseos são suscetíveis à rejeição imunológica e complicações adicionais (WINDHAGER; HOBUSCH; MATZNER, 2017). Com isso surge a necessidade da produção de novos biomateriais que, além de apresentarem biocompatibilidade, sejam também bioativos, ou seja, estimulem as células que compõem esse tecido a interagirem de forma a restaurar o tecido danificado. A degradação desse material também é um ponto de fundamental importância, pois a medida que o novo tecido é formado, espera-se que o biomaterial degrade-se, assim não necessitando de procedimentos extra para sua retirada após o tratamento (FRAGAL *et al.*, 2019; YANG, M. *et al.*, 2016).

O tecido ósseo é composto por uma fase orgânica e uma inorgânica, sendo essa última formada principalmente por nanocristais de hidroxiapatita (HA). Com base nessa composição, pesquisas na área de biomateriais voltados à engenharia de tecidos propuseram uma série de materiais que mimetizam essa estrutura partindo da utilização de biopolímeros (fase orgânica) mineralizados com a própria hidroxiapatita (fase inorgânica). Esses biomateriais são classificados como compósitos, pois são formadas por duas ou mais fases, e exibem propriedades superiores quando comparados às fases separadas. Nesse caso, a fase orgânica aumenta a flexibilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e reduz a compactação. A inorgânica, além de não tóxica, favorece a resistência mecânica, estabilidade térmica e favorece a osteointegração. Além disso, em conjunto, ambas as fases podem induzir a regeneração óssea por meio da proliferação de células osteoprogenitoras (osteoblastos e osteócitos) para dentro da matriz compósita (GOUMA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2017).

Muitos polímeros são utilizados como base orgânica na produção desses biomateriais. Compósitos à base de derivados da celulose, como celulose bacteriana oxidada (CBO) e acetato de celulose (AC), vêm sendo amplamente usados na área biomédica, seja para a entrega controlada de drogas (WSOO *et al.*, 2020) ou para a engenharia de tecidos (RAMANATHAN *et al.*, 2020), pois estes apresentam melhor solubilidade e consequentemente, melhor biodegradabilidade, em relação à celulose pura. Entre as pesquisas relacionadas a utilização de compósitos contendo celulose como base, pode-se citar o estudo desenvolvido por Fragal *et al.* (2019), onde propuseram a produção de nanocompósitos usando *nanowhiskers* de celulose quimicamente funcionalizados e combinados com cristais de hidroxiapatita sintetizados pelo método biomimético, demonstrando grande potencial na engenharia de tecido ósseo.

Com o intuito de melhorar as propriedades relacionadas à regeneração do tecido ósseo, pesquisas abordam a utilização do estrôncio (Sr) como substituinte aos íons de cálcio (Ca) presentes na HA biológica, formando a apatita de estrôncio (SrAp), pois o Sr acelera a regeneração óssea, devido suas propriedades de estimular a proliferação dos osteoblastos e inibir a ação dos osteoclastos (HORI; HIRANO; OHTA, 2017; JIMÉNEZ *et al.*, 2019) além de apresentar um comportamento antibacteriano, evitando infecção e consequentemente falhas em implantes (ANASTASIOU *et al.*, 2019; COCHIS *et al.*, 2020). Luz e colaboradores (2018) desenvolveram materiais híbridos de celulose bacteriana (CB) e HA funcionalizados com íons  $Sr^{2+}$  por meio do método de ciclos de imersão, e obtiveram membranas com grande potencial a serem usadas na regeneração óssea. Mesmo já havendo pesquisas na área que apresentam resultados interessantes utilizando a celulose, um problema ainda observado é a citotoxicidade desses materiais, pois os produtos de degradação da celulose (e derivados), como o ácido butírico e o ácido acético (LUZ *et al.*, 2020), tornam o ambiente hostil ao bom desenvolvimento dessas células.

Tendo em vista o problema descrito anteriormente, nesse trabalho foram produzidos e caracterizados, novos biomateriais híbridos a base de celulose bacteriana (natural e oxidada) e acetato de celulose comercial com apatita de estrôncio biomineralizada por meio do método biomimético, com o intuito de avaliar seus potenciais como materiais a serem aplicados no processo de regeneração óssea. Esse método é utilizado com o intuito de obter um material estável, com propriedades favoráveis à proliferação de osteoblastos.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1. Biomateriais**

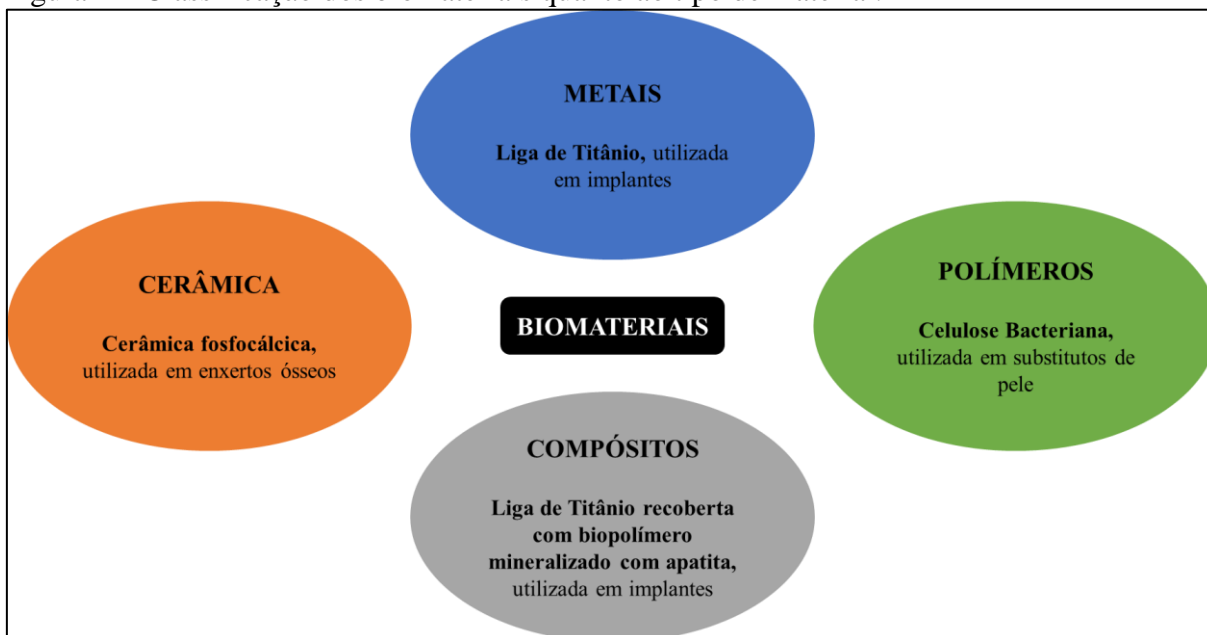
Ao longo dos anos, o termo “biomaterial” ganhou várias definições. Park & Bronzino (2003) o definiram como “um material sintético usado para substituir parte de um sistema vivo ou para funcionar em contato íntimo com o tecido vivo”. Já Chen e Thouas (2014) os definiram como “substâncias projetadas para assumir uma forma que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para dirigir, por controle de interações com componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico”. Sendo assim, eles podem ser empregados em diversos setores, como por exemplo na engenharia de tecidos, área ortopédica e em tratamentos dentários. Para que um material se enquadre nesse setor, é importante que apresentem uma série de características, tal como, boa biocompatibilidade.

Os biomateriais podem ser classificados por diversos fatores: 1) quanto ao tipo de resposta biológica e 2) quanto aos tipos de materiais empregados em sua confecção. Em relação a resposta biológica, podem ser divididos em bioinertes, bioativos, biorreabsorvíveis (SULTANA; BANDYOPADHYAY-GHOSH; SOON, 2020), biodegradáveis e biomiméticos.

Os materiais bioinertes são aqueles que provocam o mínimo possível de resposta ao hospedeiro; bioativos são aqueles que reagem de forma a favorecer a formação de tecido e estabelecer uma interface de suporte às cargas funcionais; biorreabsorvíveis são aqueles que são dissolvidos e substituídos por um novo tecido; biodegradáveis são aqueles que apresentam decomposição rápida e são rapidamente absorvidos pelo organismo; e biomiméticos são aqueles que mimetizam propriedades de materiais já existentes no organismo.

Quanto ao tipo de material, eles podem ser divididos principalmente em quatro categorias segundo Naidu, Wadher e Umekar (2021): 1) os polímeros, sintéticos e naturais, os quais apresentam grande flexibilidade e facilidade de se trabalhar, podendo citar a policaprolactona e a celulose, respectivamente; 2) os metais e suas ligas, caracterizados pela sua força, resistência e ductibilidade, podendo citar o titânio; 3) as cerâmicas, sendo muito biocompatíveis e inertes, como exemplo temos a hidroxiapatita; e 4) os compósitos, materiais formados pela junção de dois ou mais materiais com o intuito de formar um material com melhores propriedades, como os materiais híbridos a base de celulose e hidroxiapatita. A Figura 1 apresenta uma ilustração dessa divisão dos biomateriais.

Figura 1 – Classificação dos biomateriais quanto ao tipo de material.



Fonte: Adaptado de Park & Bronzino (2003).

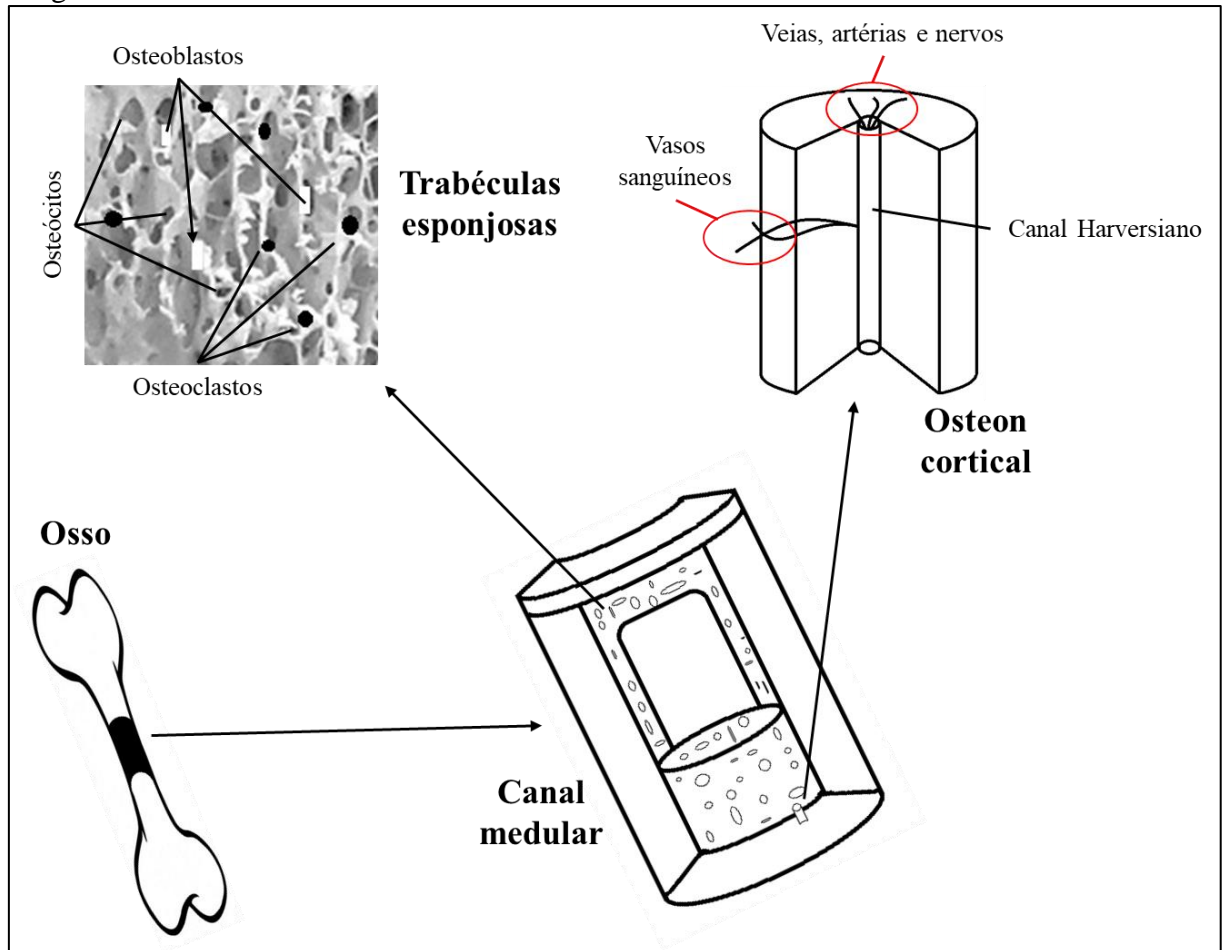
## 2.2. Tecido ósseo

O tecido ósseo é definido por Kalfas (2001) como sendo um tecido biológico dinâmico, que contém em sua composição células metabolicamente ativas integradas em uma estrutura rígida, as quais estão em constante processo de deposição, reabsorção e remodelação óssea, o que auxilia no processo de cicatrização. Diante disso, é considerado um dos tecidos conjuntivos mais ativos metabolicamente no corpo humano (BUCK; DUMANIAN, 2012), ao mesmo tempo que complexo.

A Figura 2 apresenta a estrutura tridimensional do osso, exibindo alguns componentes detalhadamente. Esse órgão possui duas categorias principais, o osso esponjoso, o qual é representado pela estrutura trabecular e pode ser observada a presença de células especializadas em sua estrutura. Os osteoblastos (massa branca) e seus derivados, os osteócitos (presentes nas lacunas), são duas dessas células, as quais são classificadas como células osteoprogenitoras. Elas recebem essa classificação por tornarem-se células formadoras de ossos (NAKAMURA *et al.*, 2020), em que os osteoblastos sintetizam e secretam matriz óssea orgânica e os osteócitos secretam outras substâncias importantes para a formação do osso. Os osteoclastos (pontos pretos), também conhecidos como células gigantes, são células que originam-se do tecido hematopoiético e são responsáveis pela reabsorção e remodelação óssea (JACOME-GALARZA *et al.*, 2019). A outra categoria é o osso denso, que constitui o sistema

Haversiano, responsável pela passagem e proteção de vasos sanguíneos, veias, artérias e nervos (BUCK; DUMANIAN, 2012; QIU; CUI; WANG, 2019).

Figura 2 – Estrutura tridimensional do osso.



Fonte: Adaptado de Buck & Dumanian (2012).

O osso é composto, principalmente, por material inorgânico, onde em sua maioria constitui-se por hidroxiapatita e apatita carbonatada; já a porção orgânica do osso é composta principalmente por colágeno do tipo I; e uma pequena parcela de água (AN *et al.*, 2016; BUCK; DUMANIAN, 2012; QIU; CUI; WANG, 2019).

Problemas ósseos, tais como malformações congênitas (casos que envolvem defeitos estruturais ou funcionais em um feto em desenvolvimento), acidentes, tumores e osteoporose (perda da densidade óssea), estão se tornando cada vez mais comuns. A substituição de membros comprometidos por implantes pode ser apresentada como uma forma de tratamento convencional.

Uma pesquisa realizada por Kinalski *et al.* (2020) constatou que, só na última década (janeiro de 2010 a dezembro de 2019), o Sistema Único de Saúde (SUS) forneceu um total de 143.037 implantes dentários. Já em relação à implantes ortopédicos, de 2008 a 2018, estatísticas do SUS indicam que o Brasil implantou 120 mil próteses de quadril e mais de 60 mil de joelho (LUCHETTI, 2018). O lado negativo relacionado aos implantes ortopédicos se dá pelo fato de que materiais comumente utilizados na fabricação de implantes tradicionais podem ser suscetíveis à rejeição imunológica e complicações adicionais (JANICKI; SCHMIDMAIER, 2011), pois tratam-se de estruturas muito distintas quando se é analisada a rigidez desses materiais.

A Tabela 1 apresenta o módulo de Young, ou módulo de elasticidade, de determinados materiais. Essa propriedade mecânica é responsável por expressar, numericamente, a rigidez de materiais sólidos. Sendo assim, um ponto importante de ser comentado, é a enorme diferença observada entre o módulo de Young do osso e do Titânio (Ti) e suas ligas (materiais comumente utilizados na confecção de implantes), no caso da Tabela 1, a liga de titânio e tântalo, o que pode acabar causando atrofia do osso ao redor do implante, pois esse ambiente receberá menor carga devido sua menor rigidez. Quanto maior for o seu módulo de elasticidade, mais rígido será esse material e menor será a deformação elástica resultante de uma tensão.

Tabela 1 – Módulo de Young para diferentes materiais.

<b>MATERIAL</b>	<b>MÓDULO DE YOUNG (GPa)</b>	<b>Referência</b>
Osso denso (cortical)	13,7	Soni <i>et al.</i> (2008)
Osso esponjoso	7,93	Soni <i>et al.</i> (2008)
Titânio	115	Zhao <i>et al.</i> (2019)
Ti-25Ta	89	Zhao <i>et al.</i> (2019)
Celulose vegetal	3	Yadav (2018)
Celulose Bacteriana	0,0053	Vasconcelos (2019)
Celulose Bacteriana Oxidada	0,0017	Vasconcelos (2019)
Acetato de Celulose	0,4	Aboamera <i>et al.</i> (2019)
Hidroxiapatita	0,49	Ahangari <i>et al.</i> ( 2021)

Fonte: Elaborada pela autora.



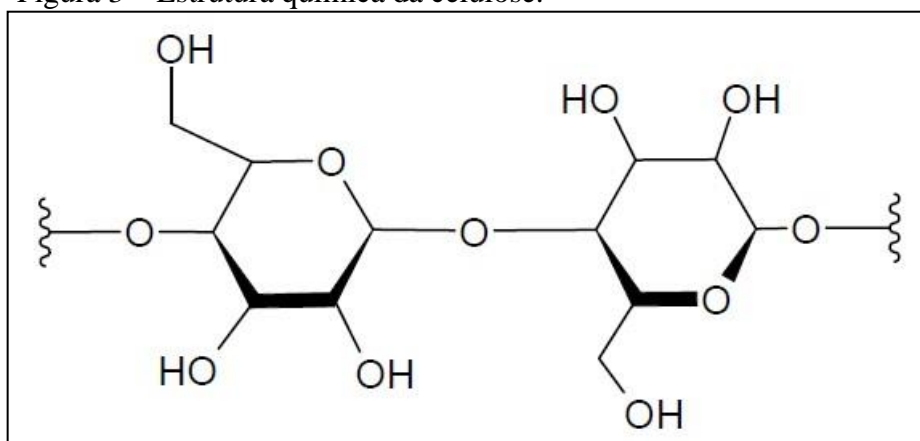
Pode-se observar ainda na Tabela 1, o módulo de Young da hidroxiapatita, componente inorgânico do osso, e da celulose (e derivados), polímero amplamente utilizado como matéria prima de biomateriais voltados à engenharia de tecidos. Esses polímeros apresentam um valor significativamente menor que os observados para o osso, o que pode se dar pela sua estrutura altamente porosa. Alguns estudos, como o desenvolvido por Ran *et al.* (2017), demonstraram que a mineralização de HA em polímeros como a CB elevou a rigidez desses materiais.

Mediante a complexibilidade em entender a estrutura do tecido ósseo, muitos pesquisadores estudam tratamentos alternativos relacionados à formas de mimetizar a estrutura óssea utilizando-se de materiais biocompatíveis e que já fazem parte de sua composição, por exemplo, Ke *et al.* (2019) e Miranda *et al.* (2019) realizaram por meio de técnica a laser, a deposição de HA em Ti e liga de Ti, respectivamente, com o intuito de melhorar as características dos implantes ortopédicos tradicionais.

### 2.3. Celulose

A celulose é o polímero natural, ou seja, o polímero produzido por seres vivos, mais abundante no mundo, podendo ser encontrado nas plantas (constituindo suas paredes celulares), sendo obtido, principalmente, a partir da madeira. A celulose é um carboidrato de cadeia linear do tipo polissacarídeo, de fórmula molecular  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , formado por moléculas de glicose unidas por ligações covalentes, conhecidas como ligações glicosídicas. Sua estrutura molecular pode ser vista na Figura 3. Por ser o principal componente da parede celular das plantas, está associada a outros biopolímeros, como lignina, pectina e hemicelulose, o que pode afetar significativamente os processos de purificação desse material. Uma forma de contornar esse problema é realizar a produção da celulose por meios alternativos, como a partir de bactérias. A celulose obtida por meio de bactérias é nomeada de celulose bacteriana, a qual conta com métodos mais simples e baratos de purificação, além de não agredir o meio ambiente.

Figura 3 – Estrutura química da celulose.



Fonte: Adaptado de O'Sullivan (1997).

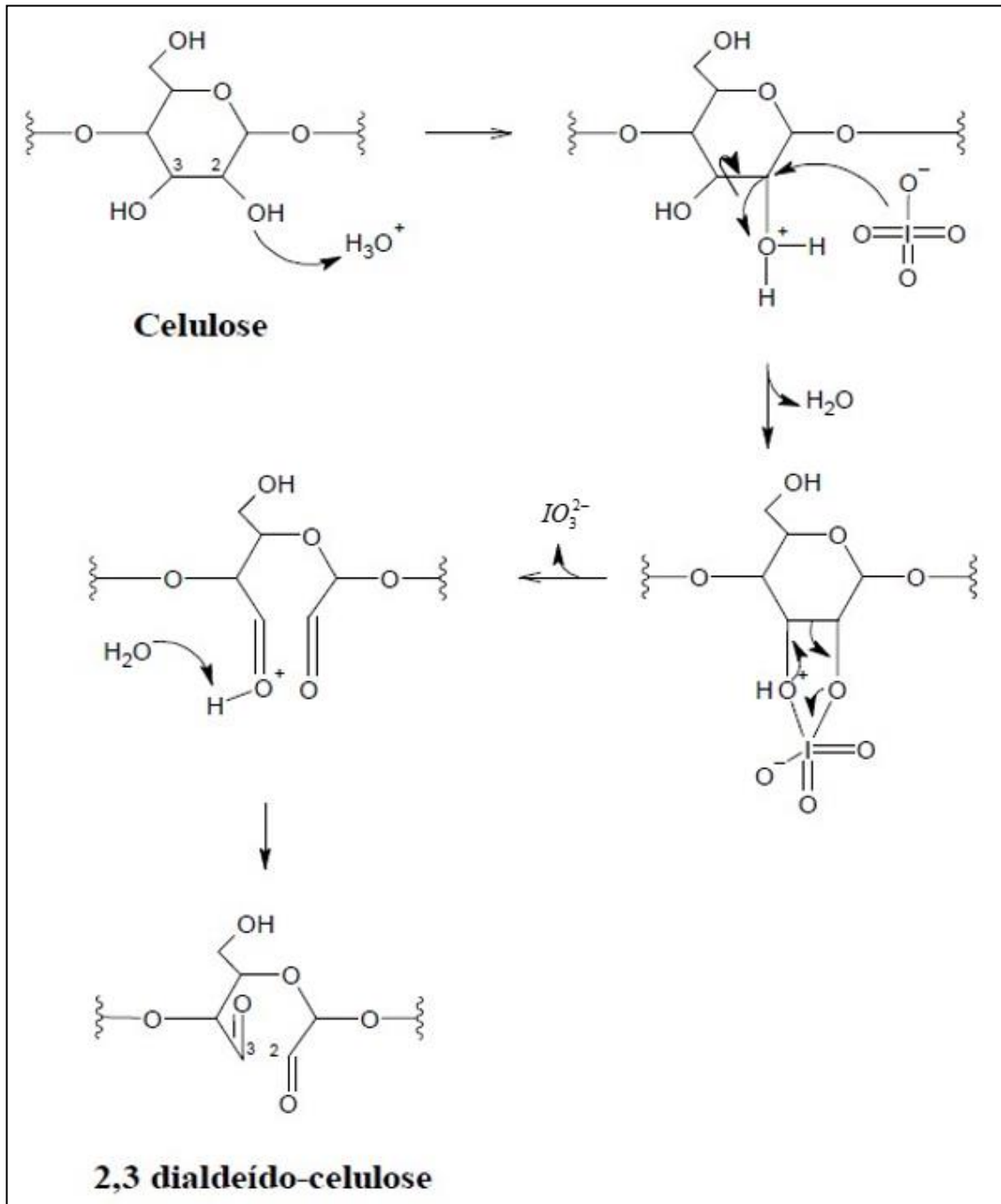
A CB é produzida a partir de bactérias, como por exemplo as do gênero *Komagataeibacter*, que além de requererem métodos simples de purificação, apresentam um menor tempo de obtenção quando comparada a celulose vegetal (GALDINO *et al.*, 2019). A CB é formada por fibras com espessuras em escalas micro e até mesmo nanométricas, as quais são excretadas pelas bactérias durante o processo de fermentação estática (CACICEDO *et al.*, 2016). Essa característica pode assegurar ao material propriedades superiores às identificadas para celulose vegetal (GALDINO *et al.*, 2019). Os arranjos de micro e nanofibras da CB lhe conferem elevadas propriedades mecânicas, como alta resistência à tração, elasticidade, durabilidade e elevada capacidade de retenção de água. Esse material possui alta biocompatibilidade (BARUD *et al.*, 2015), o que favorece sua utilização como componente de biomateriais compósitos, como membranas para a entrega de drogas (TREESUPPHARAT *et al.*, 2017; WEYELL *et al.*, 2019) e na produção de *scaffolds* a serem utilizados na engenharia de tecidos (PANG *et al.*, 2020; STUMPF *et al.*, 2018).

A CB é rica em alomorfismo Ia, e como pode ser observado pela Figura 3, a celulose apresenta uma grande quantidade de grupos hidroxila em sua estrutura, conseqüentemente, de ligações de hidrogênio, o que resulta em um material com alta cristalinidade, capacidade de absorção de líquidos e resistência à tração (CACICEDO *et al.*, 2016; PANDELE *et al.*, 2017). Como consequência dessas características, esse material apresenta uma baixa solubilidade em meios aquosos (MEDRONHO *et al.*, 2012) e baixa degradabilidade quando implantado, uma vez que organismos animais não produzem a enzima celulase, capaz de clivar as ligações covalentes presentes na cadeia de celulose (GATENHOLM; RENNECKAR, 2012). Diante desse problema, para ser utilizada na produção de biomateriais buscam-se alternativas que

agreguem uma melhor degradabilidade ao material sem perder as características importantes da celulose, pois espera-se que esse material seja degradado para que um novo tecido tome o seu lugar. Dois exemplos que merecem destaque é a oxidação da CB e a utilização de ésteres de celulose, como o acetato de celulose (AC).

A oxidação da CB pode ocorrer por meio da utilização de reações de oxidação usando o íon periodato ( $\text{IO}_4^-$ ), o qual se mostra bastante seletivo para os grupos hidroxila, ligados aos carbonos 2 e 3, presentes na estrutura da celulose. Como resultado dessa reação, há a formação de grupos aldeído, formando assim a 2,3 dialdeído-celulose (DAC) (KIM *et al.*, 2000). Essa reação foi descrita por Vasconcelos (2019) e é mostrada na Figura 4. Nesta reação, as ligações entre os carbonos 2 e 3 do anel D-glicopiranosose são clivadas, permitindo a inserção de dois grupos aldeído. Como consequência, há uma grande melhoria na degradação do material, porém as fibras formam aglomerações e a porosidade e as propriedades mecânicas são reduzidas (LUO *et al.*, 2013).

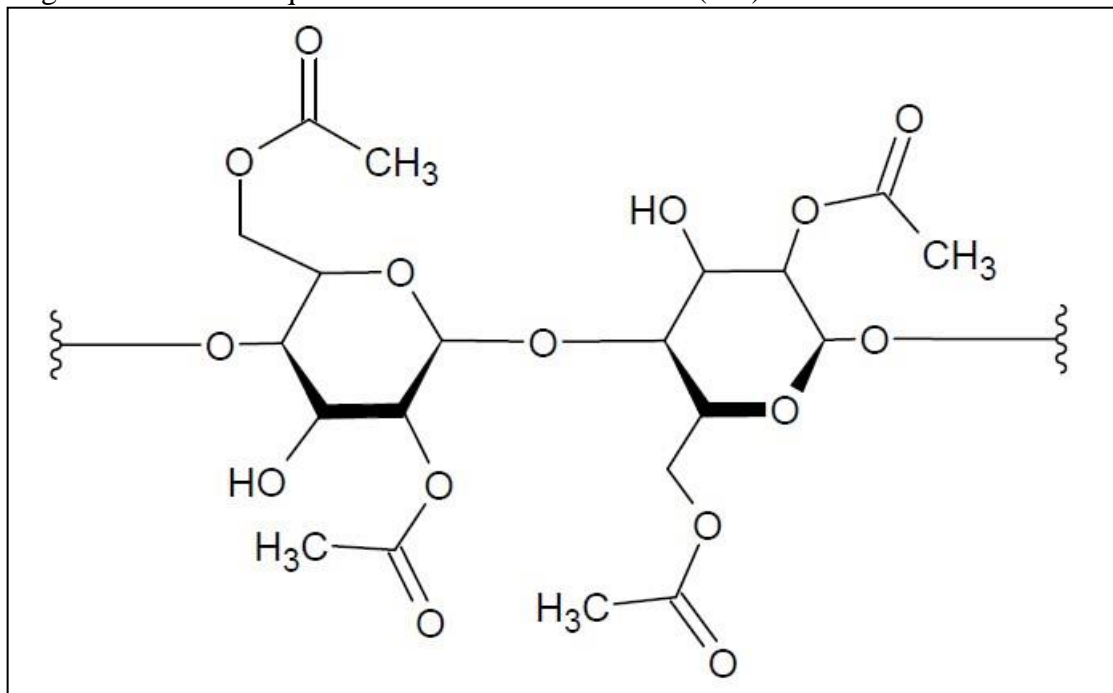
Figura 4 – Mecanismo de reação de oxidação da celulose com periodato ( $\text{IO}_4^-$ ) catalisada por meio ácido.



Fonte: Adaptado de Vasconcelos (2019).

Outro derivado da celulose muito importante, e já citado anteriormente nessa seção, é o AC. Esse polímero se enquadra como um éster de celulose, contendo grupos acetila em sua estrutura (Figura 5), o que, além de manter as propriedades da celulose, torna-o solúvel em solventes orgânicos apróticos polares (PANDELE *et al.*, 2017), pois reduz a formação de pontes de hidrogênio e compactação da estrutura, o que aumenta sua taxa de degradação.

Figura 5 – Estrutura química do Acetato de Celulose (AC).



Fonte: Adaptado de Biswas et al. (2006).

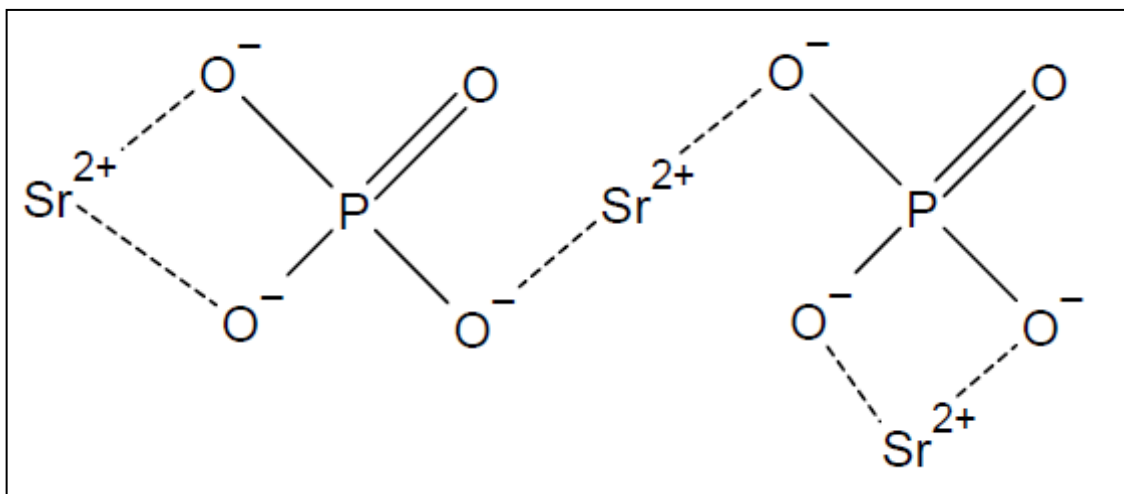
## 2.4. Estrôncio

O estrôncio, de símbolo Sr, é um elemento químico da família dos metais alcalino terrosos (grupo 2 da Tabela Periódica). Esse metal é muito abundante na natureza e é encontrado, principalmente, a partir dos minerais celestita, composto por sulfato de estrôncio ( $\text{SrSO}_4$ ), e estroncianita, composto por carbonato de estrôncio ( $\text{SrCO}_3$ ).

Os íons de estrôncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ) se assemelham aos de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), por possuírem raio atômico próximo, valência igual e rotas metabólicas bioquímicas comuns. Sendo assim, Yang e colaboradores (2011) desenvolveram uma pesquisa a fim de identificar se o Sr promoveria a diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas (MSCs) e descobriram que, além disso, ele aumenta a formação óssea *in vivo* através da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, a qual regula diversos fenômenos, entre eles os relacionados à diferenciação, polarização e migração celular. Já existem no mercado medicamentos onde o Sr é utilizado como princípio ativo, como exemplo, o ranelato de estrôncio (SrR). Essa droga é prescrita para o tratamento em casos de osteoporose do tipo grave, principalmente durante a pós-menopausa, a qual atinge mulheres acima dos 50 anos (FRASNELLI *et al.*, 2017). Entretanto, se esse medicamento for administrado a longo prazo pode acarretar uma série de complicações como coágulos sanguíneos, reações cutâneas graves, perturbações da consciência etc.

Muitos pesquisadores, como Luz *et al.* (2020) e Frasnelli *et al.* (2017), desenvolveram trabalhos na área da engenharia de tecidos ósseos, investigando a incorporação de Sr em HA, substituindo o Ca por esse metal, formando a SrAp (Figura 6). Ambos obtiveram resultados positivos. LUZ e colaboradores (2020) observaram que houve degradação do material em condições fisiológicas, bioatividade do material, baixa citotoxicidade e resposta inflamatória, aumento do reparo do tecido conjuntivo (LUZ *et al.*, 2020), já Frasnelli e colaboradores (2017) identificaram a biocompatibilidade desse compósito e sua elevada capacidade de proliferação de células de osteossarcoma SAOS-2.

Figura 6 – Estrutura molecular da Apatita de Estrôncio (SrAp).



Fonte: Adaptado de Wang et al. (2006) e Luz (2016).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Desenvolver materiais inovadores à base de celulose bacteriana (natural e oxidada) e acetato de celulose biomineralizados com apatita de estrôncio através do método biomimético, os quais apresentem potencial para atuar como biomateriais destinados a auxiliar a regeneração do tecido ósseo,

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Produzir membranas de celulose bacteriana e acetato de celulose;
- Realizar a oxidação das membranas de celulose bacteriana via periodato de sódio;
- Biomineralizar as membranas obtidas com apatita de estrôncio utilizando o método biomimético;
- Identificar a incorporação de estrôncio nos materiais celulósicos;
- Caracterizar as membranas quanto a sua composição química e morfologia;
- Avaliar a citotoxicidade dos biomateriais produzidos com células de fibroblastos de camundongo (L-929) e osteoblastos de camundongo (MC3T3-E1 Subclone 14).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

O acetato de celulose ( $M_M = 30.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A acetona, glicose, ácido cítrico, cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, cloreto de potássio, fosfato dipotássico, cloreto de magnésio e o ácido clorídrico foram obtidos pela Neon (São Paulo, SP, Brasil). A peptona foi obtida da KASVI (São José do Pinhais, PR, Brasil) e o extrato de levedura foi obtido pela ACUMEDIA (Lansing, Michigan, USA). O fosfato de sódio dibásico, sulfato de sódio e o cloreto de estrôncio foram obtidos pela DINÂMICA (Indaiatuba, SP, Brasil). Água ultrapura (tipo 1) foi obtida por meio de um Milli-Q® Direct Water Purification System (EMD Millipore, Burlington, MA, EUA).

### 4.2. Métodos

#### 4.2.1. Produção de membranas de Celulose Bacteriana (CB)

Para a produção das membranas de celulose bacteriana (CB) foram utilizadas cepas de *Komagataeibacter hansenii* (ATCC 53582) e o procedimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia da Biomassa (LTB) da EMBRAPA Agroindústria tropical. Inicialmente, foi preparado o meio de cultura para preparação do inóculo, como descrito por Hestrin & Schramm (HS) (1954):  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicose,  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de peptona,  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de extrato de levedura,  $1,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido cítrico e  $2,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de fosfato de sódio dibásico foram dissolvidos em água e ágar. A ativação do organismo ocorreu a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 72 h em meio HS contendo ágar. Em seguida, parte da massa foi removida e colocada em frasco Scott, contendo 100 mL do meio HS e incubado a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  por mais 3 dias. Depois disso, foi adicionado 5% (v/v) do inóculo em frascos Scott com 100 mL de meio líquido HS, e incubado durante 5-6 dias a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Após o período de incubação, as membranas de CB foram lavadas em água corrente e, posteriormente, iniciou-se o processo de purificação, que consistiu em imergir as membranas em água destilada e aquecê-las a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 h. Esse procedimento foi realizado duas vezes para remover o excesso de meio de cultura e o conteúdo microbiano. Para a remoção completa das bactérias e do meio de cultura, a CB foi tratada duas vezes com uma solução de  $\text{K}_2\text{CO}_3$   $0,3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 h. Finalmente, as membranas de CB purificadas foram lavadas com água destilada a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  até atingirem pH neutro.



#### **4.2.2. Oxidação da Celulose Bacteriana (CBO)**

A oxidação da CB foi baseada na metodologia descrita por Vasconcelos *et al.* (2020). Primeiramente foi realizado o pré-tratamento das membranas purificadas, que consiste na imersão do material em solução de KCl-HCl (pH 1) durante 24 h. Posteriormente as membranas de CB foram adicionadas ao sistema de reação contendo periodato de sódio (NaIO<sub>4</sub>) dissolvido na mesma solução de KCl-HCl (pH 1) utilizada anteriormente, pré-aquecida a 55 °C e com rotação constante de 125 rpm em um Banho Maria Dubnoff (Quimis, Q226M, Diadema, SP, Brasil). A reação de oxidação ocorreu durante 6 h sob ausência de luz. A oxidação foi realizada de acordo com as seguintes razões experimentais: BC/NaIO<sub>4</sub> (1,0 g/1,5 g) e BC/KCl – HCl (0,356 g/50 mL). Após o período de oxidação, a reação foi parada pela adição de 12,5 mL de etilenoglicol a 25 °C durante o período de 1 h, com a finalidade de decompor o periodato restante. Por fim, o material resultante foi lavado diversas vezes com água deionizada a 25 °C até atingir pH 7.

#### **4.2.3. Produção de membranas de Acetato de Celulose (AC)**

As membranas de AC foram produzidas preparando uma solução de acetato de celulose a 2% (m.v<sup>-1</sup>) em acetona P. A. (NANDI; UPPALURI; PURKAIT, 2009). Essa solução foi mantida sob agitação constante (500 rpm) e temperatura ambiente durante o período de 1 h em um agitador magnético (Drehzahl electronic, IKAMAG REO, Alemanha) e, posteriormente foi sonicada durante 30 minutos em um banho ultrassônico (Unique, USC 1450, Brasil) com o intuito de dissolver e homogeneizar completamente a solução. Em seguida, 25 mL dessa solução foi colocada em placas Petri de vidro (8x1,5 cm) para a formação da membrana por meio da evaporação do solvente utilizado (acetona) em temperatura ambiente por cerca de 30 min. Passado esse tempo, as membranas foram lavadas repetidas vezes com água destilada, secas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e então armazenadas para testes e processos futuros.

### 4.3. Técnicas de Caracterizações

#### 4.3.1. Grau de intumescimento e Bioatividade *in vitro*

O grau de intumescimento (em %) e a bioatividade foram avaliados de forma semelhante, conforme o método descrito por Liu et al. (2005). As membranas de celulose bacteriana (CB), celulose bacteriana oxidada (CBO) e acetato de celulose (AC), foram secas e cortadas em tamanhos de 1 cm<sup>2</sup>. Posteriormente elas foram testadas em dois solventes distintos, água destilada (pH 7) e SBF (pH 7,4), com o intuito de avaliar seu comportamento de intumescimento e biomineralização, respectivamente. A solução de SBF utilizada nesse teste foi feita seguindo a metodologia proposta por Bohner & Lemaitre (2009). As amostras foram imersas nessas soluções (10 mL) em uma temperatura de 25 ± 1 °C e retiradas em intervalos fixos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30 e 40 min. O excesso de solvente foi retirado com papel filtro (Quanty, 8 µm) e as amostras foram posteriormente pesadas. Os testes foram realizados em triplicata. O grau de intumescimento foi calculado de acordo com a equação 1:

$$GI = \frac{m_I - m_s}{m_s} \cdot 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: GI é o grau de intumescimento,  $m_I$  é a massa da amostra inchada e  $m_s$  é a massa amostra seca.

#### 4.3.2. Biomineralização de SrAp

Para realizar a incorporação da apatita modificada com Sr<sup>2+</sup> nas membranas já produzidas (CB, CBO e AC), foi seguido o método biomimético. O fluido corporal simulado (SBF) foi produzido seguindo a metodologia proposta por Bohner & Lemaitre (2009) com a substituição da solução de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) presente em sua composição por cloreto de estrôncio (SrCl<sub>2</sub>). Com o intuito de evitar a precipitação prévia da apatita, duas soluções, A e B, contendo 500 mL cada, foram preparadas sob agitação lenta constante. A composição dessas soluções estão presentes na Tabela 2. Após o preparo das duas primeiras, a solução B foi adicionada lentamente à solução A para ocorrer a formação do SBF modificado (m-SBF) com íons Sr<sup>2+</sup>.

Tabela 2 – Composição do fluido corporal simulado (SBF).

COMPOSIÇÃO	SOLUÇÕES (g.L <sup>-1</sup> )	
	A	B
<b>NaCl</b>	6,213	6,213
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	5,948	-
<b>KCl</b>	0,450	-
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O</b>	0,462	-
<b>MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	0,622	-
<b>SrCl<sub>2</sub></b>	-	0,381
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0,144	-
<b>HCl 1M</b>	0,850*	0,850*

\* Unidade de medida: mL.L<sup>-1</sup>

Fonte: Adaptado de Bohner & Lemaitre (2009).

As membranas, ainda úmidas, foram imersas em solução de m-SBF em um Banho Maria Dubnoff (Quimis, Q226M, Diadema, SP, Brasil) com temperatura de  $37,0 \pm 0,5$  °C e agitação leve, por períodos de 7 e de 14 dias. A proporção utilizada foi a mesma apresentada no Item 4.3.2., 1 cm<sup>2</sup> de material para 10 mL de m-SBF. Após os períodos pré-estabelecidos, as membranas dispostas na Tabela 3 foram obtidas e lavadas com água destilada, congeladas e posteriormente secas por liofilização durante 48 h e armazenadas para futuros testes.

Tabela 3 – Membranas obtidas após o processo de biomineralização de SrAp.

Polímero	Dias em contato com m-SBF	Nomenclatura
Celulose Bacteriana	0	CB
	7	CB7dSrAp
	14	CB14dSrAp
Celulose Bacteriana Oxidada	0	CBO
	7	CBO7dSrAp
	14	CBO14dSrAp
Acetato de Celulose	0	AC
	7	ACO7dSrAp
	14	ACO14dSrAp

Fonte: Elaborada pela autora.

Para observar a quantidade incorporada de estrôncio nas matrizes híbridas, usou-se a metodologia descrita por Luz (2016). Foram coletadas alíquotas das soluções utilizadas e medidas as concentrações residuais de estrôncio por meio de Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) (AA240FS FAST Sequential Atomic Absorption Spectrometer), no comprimento de onda de 460 nm, correspondente ao estrôncio. Essa análise foi realizada no Laboratório Núcleo de Águas (LANAGUA) da Universidade Federal do Ceará. As especificações de funcionamento do equipamento foram: utilização de lâmpadas de cátodo oco de Sr e a utilização de acetileno e ar comprimido como gás combustível e gás suporte, respectivamente. Os valores fornecidos estão em absorbância (abs), necessitando a utilização de uma curva de padronização para calcular as concentrações das amostras. A curva padrão foi preparada nas concentrações de 0 - 7 mg·L<sup>-1</sup>, obtidas a partir da solução padrão de Sr (SpecSol®, São José dos Campos, Brazil) com adição do supressor de ionização K (2000 mg·L<sup>-1</sup>) e removedor de interferentes, lantânio (La) 1%, para aumentar a sensibilidade do equipamento devido a utilização do gás ar-acetileno. Com os valores de absorbância foi plotado um gráfico (mg·L<sup>-1</sup> vs. abs) e então determinada a equação da reta. O cálculo da quantidade de Sr incorporada, ou seja, da quantidade adsorvida pela membrana, está disposto na Equação 2:

$$Q_{ads} = \frac{(C_0 - C_t) \cdot V}{m} \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde:  $Q_{ads}$  é a quantidade adsorvida de Sr por unidade de massa da amostra de membrana no tempo  $t$  ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ );  $C_0$  é a concentração inicial de Sr na solução de m-SBF ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $C_t$  é a concentração de Sr na solução de m-SBF no tempo  $t$  ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $V$  é o volume da solução de m-SBF usada no experimento (L); e  $m$  é a massa úmida da amostra de membrana utilizada (g).

#### 4.3.3. *Microscopia Eletrônica de Varredura - Espectroscopia por Energia Dispersiva (MEV-EDS)*

As micrografias de MEV acompanhada dos dados de EDS foram obtidos com o intuito de averiguar o material quanto à sua morfologia e composição química presente em sua superfície. Essas análises foram realizadas na Central Analítica-UFC (financiada pelos programas Finep-CT-INFRA, Pró-Equipamentos CAPES, e MCTI-CNPq-SisNano2.0). As amostras foram montadas em stubs utilizando-se de fitas de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro (20 nm) usando um aplicador sputter (K650, Emitech, França) e observadas usando um microscópio eletrônico de varredura Quanta 450 FEG (FEI Company, Hillsboro, Oregon, EUA). Os diâmetros dos poros/fibras das membranas estudadas foram medidos a partir das imagens obtidas pelo MEV usando o software ImageJ (domínio público). Foram medidos 135 pontos de cada uma das imagens observadas.

#### 4.3.4. *Difração de raios X (DRX)*

Com o intuito de analisar a cristalinidade das membranas estudadas, os espectros de DRX foram obtidos a partir das membranas secas dos materiais estudados, juntamente ao Laboratório de Raios X-UFC, utilizando um X'Pert PRO MPD (40 kV, 40 mA, PANalytical B.V, Holanda) com radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ), com velocidade de varredura de  $0,5^\circ \cdot \text{min}^{-1}$  e ângulo de  $2\theta$ , variando de  $10^\circ - 100^\circ$ . Os dados resultantes desse processo foram ajustados usando o software Origin8 (OriginLab Corp, Northampton, Massachusetts, USA). O índice de cristalinidade (ICr), foi calculado seguindo o método empírico proposto por Segal *et al.* (1959), presente na Equação 3.

$$ICr = \left[ \frac{I_t - I_a}{I_t} \right] \cdot 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:  $I_t$  representa a intensidade máxima da reflexão cristalina localizada próxima ao ângulo  $2\theta \sim 20^\circ$ ; e  $I_a$  representa a intensidade de difração da banda amorfa localizada próxima ao ângulo  $2\theta \sim 18^\circ$ .

#### ***4.3.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)***

O estudo dos espectros de FTIR foi realizado com o intuito de confirmar a interação entre as membranas e a SrAp por meio da presença de grupos funcionais que as compõem. Foi utilizado o equipamento Perkin Elmer® modelo spectrum two. As amostras foram moídas e compactadas com brometo de potássio (KBr) (5% m.m<sup>-1</sup>). A faixa de leitura foi entre 4000 cm<sup>-1</sup> – 400 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e 32 varreduras.

#### ***4.3.6. Ensaio de citotoxicidade in vitro***

A citotoxicidade dos materiais foi avaliada pelo método indireto, seguindo a metodologia protocolada pela norma regulamentadora ISO10993-12 (2012) no qual a viabilidade celular é medida após a exposição das células aos extratos da amostra. Para a preparação dos extratos, inicialmente, as amostras foram cortadas em formato quadrado com área aproximada de 100 mm<sup>2</sup> e esterilizadas por meio de autoclave, com temperatura de 121 °C durante um período de 20 min. Amostras liofilizadas de cada material foram colocadas em placas de 24 poços (cada uma em um poço diferente) com 1 mL de meio de cultura, sendo parte delas com DMEM suplementado (10% FBS e 1% penicilina-estreptomicina) e a outra parte com  $\alpha$ -MEM suplementado (10% FBS e 1% penicilina-estreptomicina). Posteriormente elas foram incubadas a 37 °C por 24 h (5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade). Após o período de incubação, os extratos obtidos foram coletados e armazenados em tubos do tipo Falcon, tomando a precaução de não recolher também partes da membrana.

Fibroblastos de camundongo (L-929) e osteoblastos de camundongo (MC3T3-E1 Subclone 14) foram semeadas em meio DMEM suplementando (10% FBS e 1% penicilina-estreptomicina) e meio  $\alpha$ -MEM suplementado (10% FBS e 1% penicilina-estreptomicina), respectivamente, em placas de 96 poços com densidade de  $6 \times 10^3$  células·poço<sup>-1</sup>, seguida de incubação a 37 °C (5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade) durante o período de 24 h. Após esse período, o meio de cultura foi removido dos poços e em contrapartida adicionou-se 0,1 mL dos extratos nos poços e as placas foram novamente incubadas a 37 °C por 24 e 48 h (5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade). Após esses períodos, os extratos foram removidos dos poços, limpos com solução tampão de PBS (pH 7,4), e posteriormente adicionou-se 0,12 mL de meio de cultura contendo 10% (concentração final de 2,5 mg/L) da solução de Resazurina e então as placas foram novamente incubadas a 37 °C por 4 h (5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade). Após esse período, foram transferidos 0,1 mL da solução de AlamarBlue metabolizado pelas células para uma nova placa de 96 poços e os poços foram lidos em leitor de microplacas (SpectraMax i3x, Molecular Device, Sunnyvale, EUA), em modo fluorescência ( $\lambda_{\text{excitação}} = 560$  nm e  $\lambda_{\text{emissão}} = 590$  nm). O controle negativo foi feito expondo as células ao respectivo meio de cultura, e o controle positivo foi feito expondo as células à uma solução de DMSO 40% diluído em seus respectivos meios, tornando assim, nessa concentração, o ambiente altamente citotóxico para as células. A porcentagem de células metabolicamente ativas foi calculada usando a Equação 4.

$$V_c (\%) = \frac{F_{\text{amostra}}}{F_{\text{controle}}} \cdot 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:  $V_c$  representa a viabilidade celular,  $F_{\text{amostra}}$  representa a fluorescência correspondente ao poço onde as células foram cultivadas na presença do extrato da amostra e  $F_{\text{controle}}$  representa a fluorescência correspondente ao poço onde as células foram cultivadas somente na presença de seus respectivos meios de cultura.

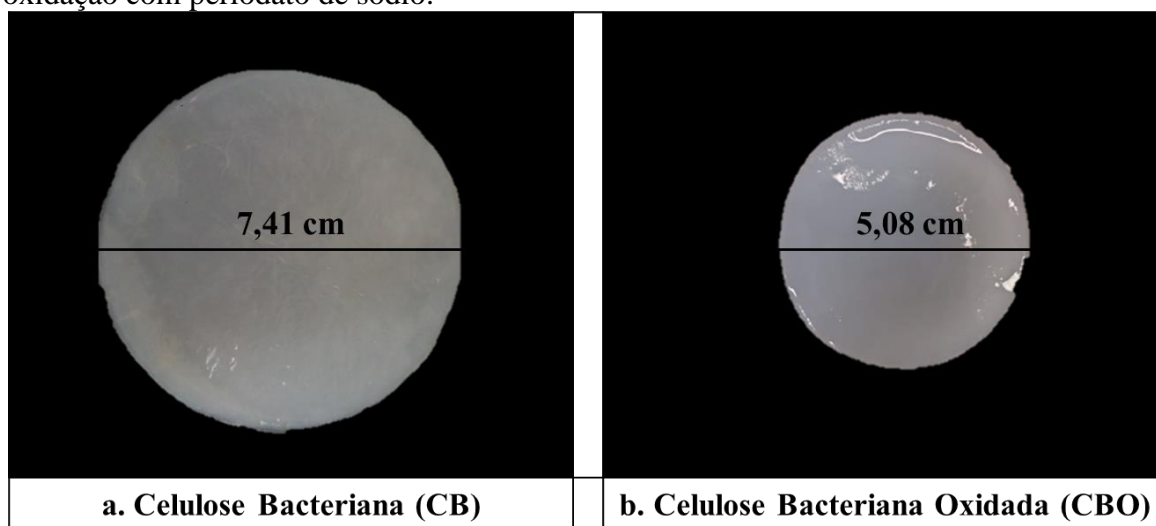
Os ensaios foram realizados em triplicata ( $n = 3$ ), com o intuito de obter melhor representatividade dos resultados. A atividade metabólica das células do grupo controle negativo foi ajustada para 100% para o cálculo dos valores médios e desvio padrão.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Membranas produzidas

Como já era esperado, de acordo com o trabalho desenvolvido por Vasconcelos (2019), as membranas de celulose bacteriana oxidada (CBO) apresentaram uma grande diferença, em seu tamanho, em relação às membranas de CB antes de passarem pela reação de oxidação. A partir da Figura 7, pode-se perceber a diminuição no diâmetro da membrana, a qual perde, aproximadamente,  $31,3 \pm 0,5$  % de seu tamanho original. As espessuras dessas membranas são de, aproximadamente,  $5 \pm 0,5$  mm e  $4,5 \pm 0,5$  mm, respectivamente. Essas condições de oxidação (temperatura de  $55$  °C e tempo de reação de 6 h, grau de oxidação de 50 %) foram estudadas por Vasconcelos (2019) para obtenção de um material que apresentasse uma maior quantidade de aldeídos em sua estrutura, perdendo o mínimo possível de massa, já que, o processo de oxidação pode continuar ocorrendo e os grupos aldeído podem formar grupos cetona e carboxílico.

Figura 7 – Diâmetro das membranas de celulose bacteriana (CB) antes (a) e após (b) sua oxidação com periodato de sódio.



Fonte: Elaborada pela autora.

As membranas de AC obtidas apresentam morfologias totalmente diferentes das observadas anteriormente. A Figura 8 apresenta uma foto dessa membrana. O diâmetro obtido foi de, aproximadamente,  $8 \pm 0,5$  cm e espessura de 1 mm.



Figura 8 – Vista superior da membrana de acetato de celulose (AC).

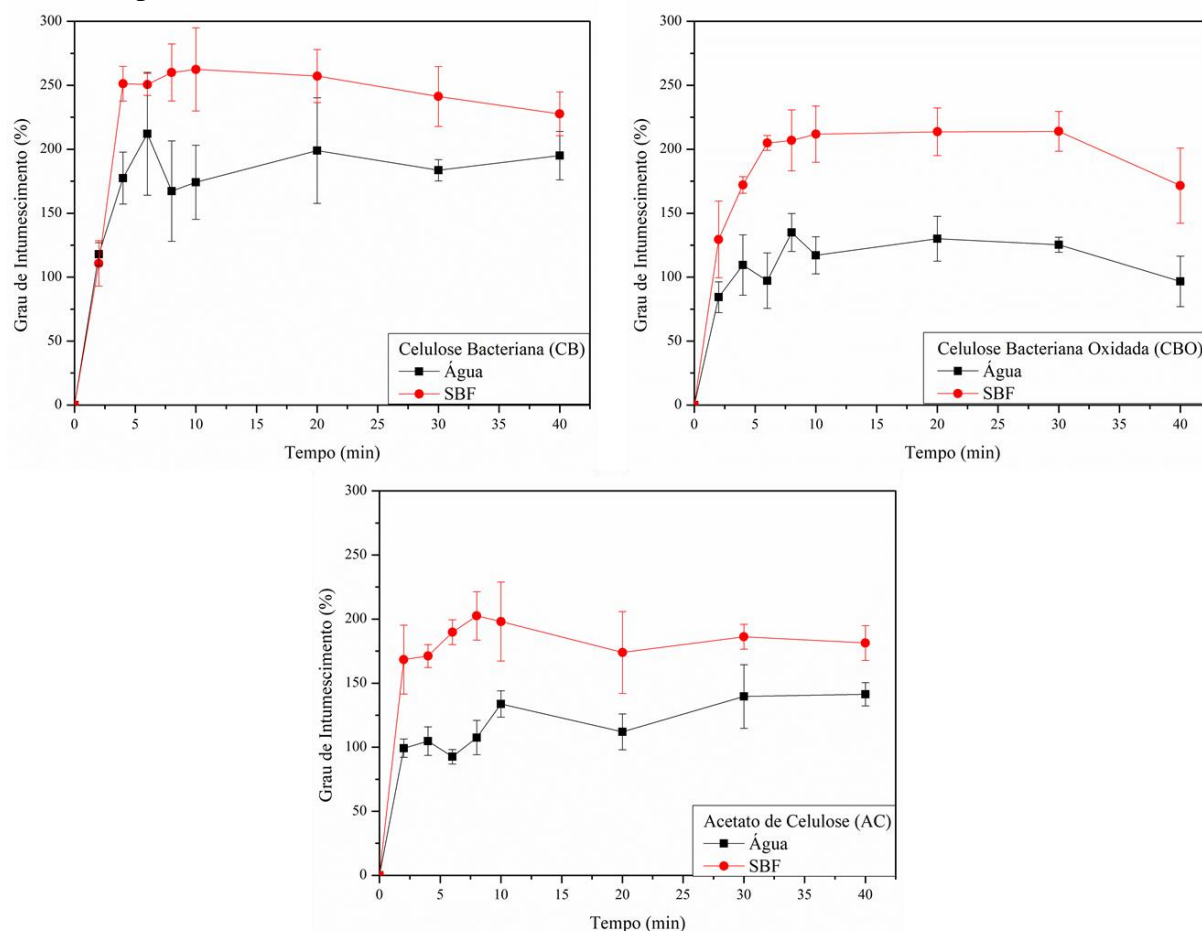


Fonte: Elaborada pela autora.

## 5.2. Grau de intumescimento e Bioatividade *in vitro*

O grau de intumescimento e a bioatividade *in vitro* foram investigados a fim de entender o comportamento de dilatação e biomineralização das membranas de AC, CB e CBO. Essas são análises de grande importância quando se trata da produção de biomateriais, principalmente os destinados a participar de interações diretas com os fluidos corpóreos, pois é o que permite a absorção desses fluidos, além da transferência de moléculas de sinalização e nutrientes celulares dentro do *scaffold*, estruturas essas que funcionam como suporte para o crescimento celular (TAN *et al.*, 2020). Por esse motivo, essa análise foi realizada utilizando-se de água e SBF como solventes, para simular e entender como esses materiais reagiriam em contato com os fluidos corporais. A Figura 9 apresenta as curvas referentes ao grau de intumescimento (água) e à bioatividade (SBF) das amostras de AC, CB e CBO.

Figura 9 – Grau de intumescimento e bioatividade *in vitro* das membranas de celulose bacteriana (CB), celulose bacteriana oxidada (CBO) e acetato de celulose (AC) em água e SBF, respectivamente.



Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser observado na Figura 9, a estrutura das membranas facilitou o intumescimento, fazendo com que rapidamente as amostras atingissem o equilíbrio, cerca de 10, 4 e 8 min após o início do contato com água, para as amostras de AC, CB e CBO, respectivamente. Já ao estudar o comportamento dessas amostras em contato com SBF, os tempos de equilíbrio foram, respectivamente, 6, 4 e 6 min. Em todos os casos observados, os polímeros obtiveram maior capacidade de absorção em contato com a solução de SBF. A Tabela 4 apresenta esses valores.

Tabela 4 – Tempo e grau de intumescimento das membranas de acetato de celulose (AC), celulose bacteriana (CB) e celulose bacteriana oxidada (CBO) no equilíbrio.

AMOSTRA	TEMPO DE EQUILÍBRIO (min)		G. DE INTUMESC. NO EQ. (%)	
	Água	SBF	Água	SBF
AC	10	6	131,64% ± 13,52%	188,64% ± 10,56%
CB	4	4	186,95% ± 15,76%	250,07% ± 12,15%
CBO	8	6	120,82% ± 15,03%	203,81% ± 16,20%

Fonte: Elaborada pela autora.

Para as membranas de AC, pode-se observar um aumento no inchaço na solução de SBF de aproximadamente 43,3% em relação a água. Já para as amostras de CB e CBO, esses aumentos foram de aproximadamente 33,8 e 68,7%, respectivamente. O maior aumento vindo das membranas de AC e CBO podem ser resultado do acréscimo do grupo carbonila (C=O) nessas duas membranas.

Os resultados obtidos comprovaram a hidrofiliabilidade dessas membranas, o que resulta, provavelmente, das ligações de hidrogênio formadas entre as moléculas de água e os grupos hidrofílicos presentes nas membranas, como o grupo hidroxila, e para o AC e CBO, o grupo carbonila, que possui grande afinidade com as moléculas de água por serem grupos com propriedades polares.

Quanto ao teste de bioatividade com as membranas em imersão na solução de SBF, pode-se perceber que houve uma grande melhora em relação à capacidade de absorção de líquidos em comparação ao teste realizado em água destilada, o que pode, segundo Vishal Gupta & Shivakumar (2012), ser resultado da ionização de grupos carboxilatos devido à maior concentração de constituintes polares, como íons metálicos provenientes da solução de SBF que levaram a um aumento na pressão osmótica entre a membrana e o solvente. Com a junção desse fator à presença de grupos hidrofílicos na estrutura dessas membranas, além das ligações de hidrogênio, são criadas interações eletrostáticas e de Van der Waals na interface líquido-sólido e, de acordo com as propriedades eletrônicas dos cátions em SBF, a interação entre elas pode ser favorecida.

### 5.3. Incorporação de SrAp

No preparo da solução de m-SBF foi possível realizar a substituição de  $\text{CaCl}_2$  por  $\text{SrCl}_2$ , o que se deu por conta da similaridade dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Sr}^{2+}$ , pois esses íons possuem raio atômico próximo, valência igual e rotas metabólicas bioquímicas comuns.

A incorporação de SrAp nas membranas estudadas se deu pela deposição de íons  $\text{Sr}^{2+}$  e fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) nessas membranas, formando assim fosfatos de estrôncio com interações intramoleculares do tipo iônica. A celulose conta com uma grande quantidade de grupos hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) livres em sua superfície, favorecendo assim a ligação iônica entre esse grupo de carga negativa e o  $\text{Sr}^{2+}$  que conta com carga positiva. Essa deposição foi investigada avaliando a quantidade adsorvida ( $Q_{\text{ads}}$ ) de Sr nas membranas de AC, CB e CBO após tempos de imersão de 7 e 14 dias, como foi descrito na metodologia. Esses tempos são necessários, pois mesmo observando tempos de equilíbrio entre 4 e 10 min para o estudo de bioatividade presente no Item 5.2, não é suficiente para ocorrer a efetiva, e estável, biomineralização da SrAp nessas membranas. Os resultados obtidos podem ser conferidos na Tabela 5.

Tabela 5. Incorporação de Sr em membranas de acetato de celulose (AC), celulose bacteriana (CB) e celulose bacteriana oxidada (CBO).

Polímero	$Q_{\text{ads}}$ ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	
	7 dias	14 dias
Celulose Bacteriana	$65,79 \pm 1,41$	$68,56 \pm 1,47$
Celulose Bacteriana Oxidada	$36,95 \pm 8,05$	$41,50 \pm 7,93$
Acetato de Celulose	$47,11 \pm 8,60$	$37,45 \pm 6,11$

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao analisar os dados presentes na Tabela 5, é possível verificar que houve a efetiva incorporação de estrôncio nas membranas estudadas. Com essa análise, foi possível observar que a maior quantidade de Sr incorporado nas membranas ocorreu nos primeiros 7 dias de contato, não havendo um aumento significativo de adsorção desse íon nos dias subsequentes.

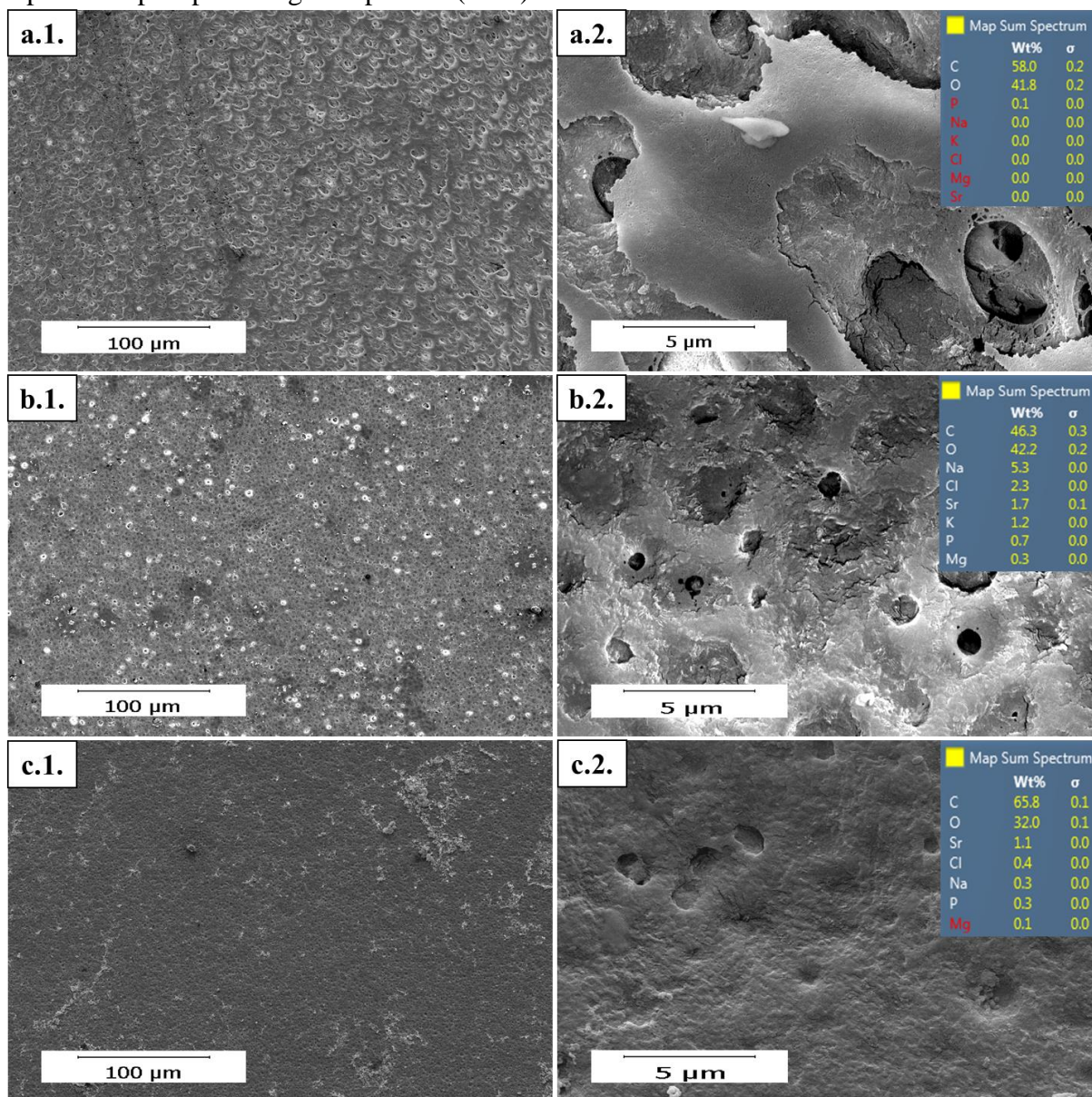
#### 5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura - Espectroscopia por Energia Dispersiva (MEV-EDS)

Sabe-se que há a necessidade de desenvolver uma estrutura porosa como *scaffold* para que simule o tecido ósseo e ocorra, da melhor forma possível, a transferência de oxigênio e nutrientes fundamentais para a migração e crescimento das células ósseas especializadas no interior do *scaffold*. A permeabilidade em consequência de uma porosidade superior contribui para a liberação de  $\text{Sr}^{2+}$ , favorecendo a formação óssea e evitando a reabsorção óssea. Por esse motivo, é de fundamental importância produzir materiais porosos.

O método descrito no Tópico 4.2.3. é conhecido como inversão de fase por precipitação em imersão (KUNST; SOURIRAJAN, 1974). Como descrito na metodologia aplicada, as membranas de AC foram preparadas sendo diluídas em acetona e posteriormente deixadas para secar em placas Petri, para que o solvente fosse evaporado. Após um curto período, houve a imersão das membranas formadas em água destilada, onde houve uma troca entre o solvente utilizado e a água, favorecendo a precipitação remanescente e a modulação dos poros na estrutura da membrana. Por outro lado, este processo não é capaz de controlar a porosidade dessas membranas, ou seja, não se obtêm uma uniformidade em número e tamanho de poros. Na produção da CB e CBO também não há um controle totalmente efetivo para uniformizar o diâmetro das fibras.

A Figura 10 (a.1. e a.2.) representa a membrana de AC sem tratamento com m-SBF, então, como já era esperado, apresenta uma estrutura porosa irregular, como já foi visto em pesquisas anteriores (PANDELE *et al.*, 2017). É possível observar ainda que há uma certa profundidade nos poros dessa membrana.

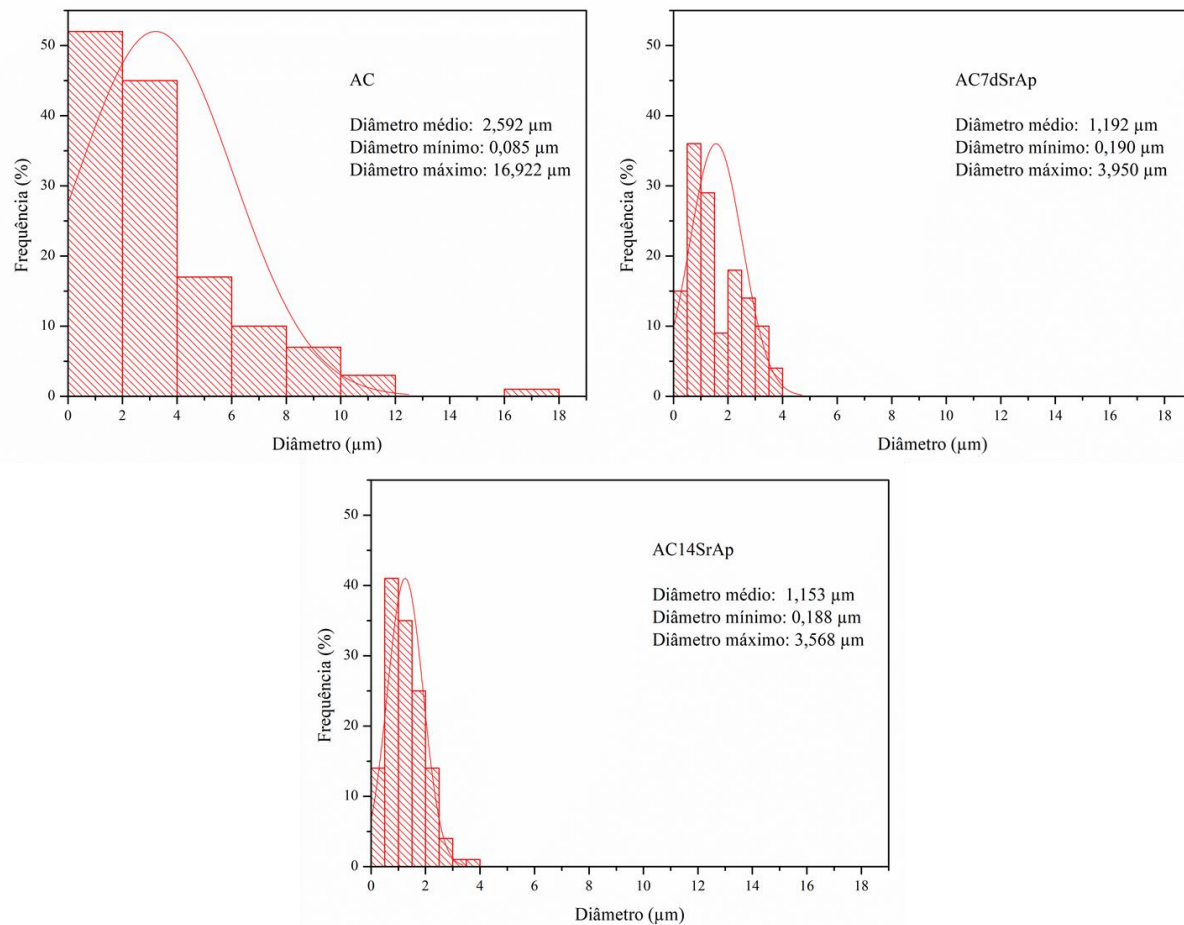
Figura 10 – Micrografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies de AC (a.1. e a.2.), AC7dSrAp (b.1. e b.2.) e AC14dSrAp (c.1. e c.2.) e suas respectivas espectroscopias por energia dispersiva (EDS).



Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 11 (AC) representa a distribuição de diâmetro de poros das membranas de AC, e pode-se observar uma grande variação de diâmetro em seus poros, o que já era de se esperar observando a Figura 10 (a.1. e a.2.). Essa membrana tem como diâmetro mínimo de poros, 0,085 μm e como máximo, 16,922 μm. Seu diâmetro médio é  $2,592 \pm 2,851$  μm. Em seu respectivo EDS, pode-se observar que não há elevações em faixas relacionadas a nenhum dos íons de interesse da solução de m-SBF ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Sr}^{2+}$ ).

Figura 11 – Distribuição de diâmetro de poros das membranas de AC, AC7dSrAp e AC14dSrAp, e suas respectivas curvas de distribuição normal.



Fonte: Elaborada pela autora.

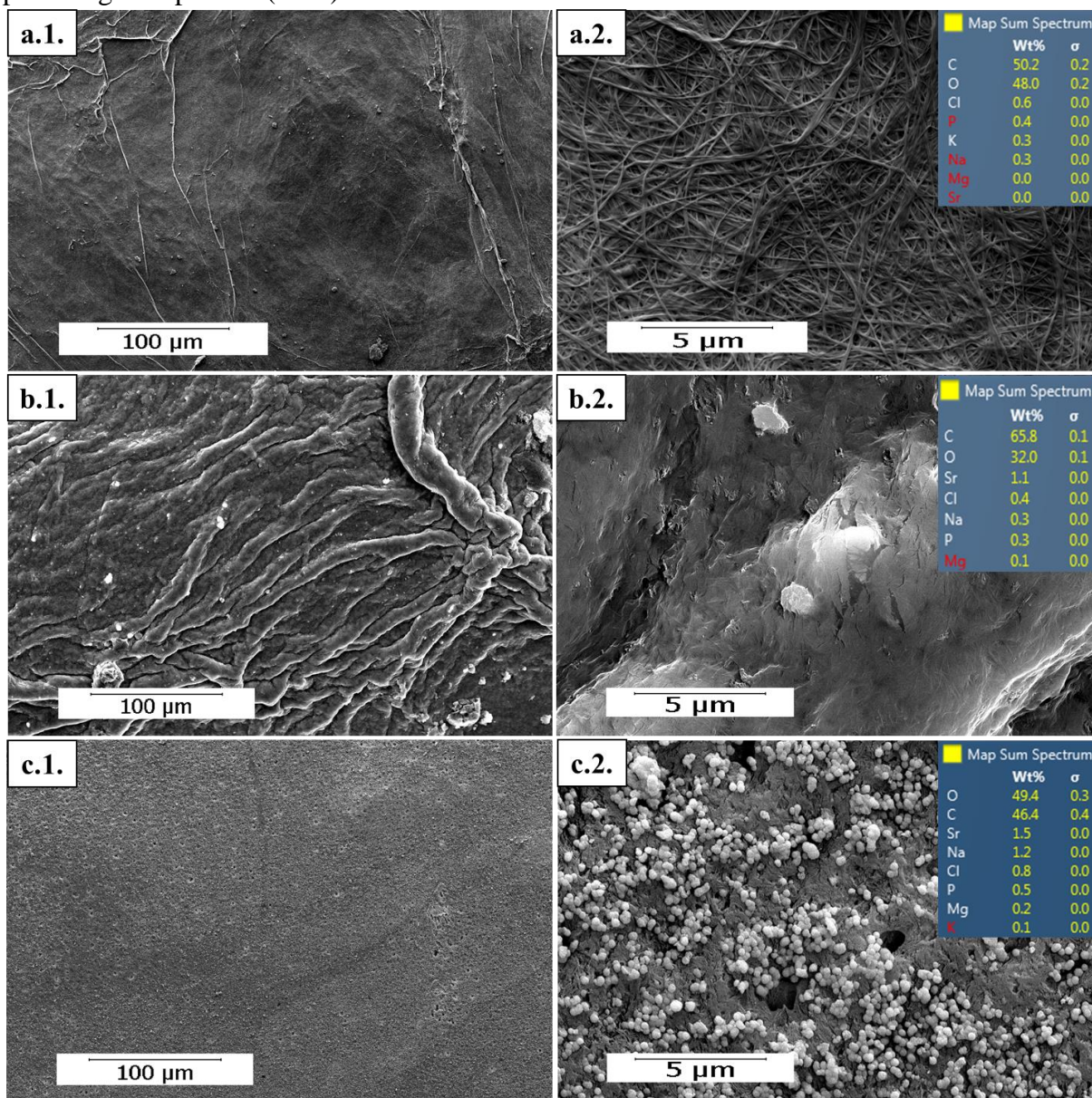
A Figura 10 (b.1. e b.2.) representa a membrana de AC após imersão na solução de m-SBF por 7 dias (AC7dSrAp) para mineralização de SrAp em sua superfície. A membrana exibiu uma morfologia diferente da observada anteriormente, onde pode-se notar a presença de pequenos cristais pertencentes à SrAp. De acordo com a Figura 11 (AC7dSrAp), pode-se notar que a distribuição de diâmetros de poros está mais concentrada, exibindo uma menor faixa de variação. Os poros dessa membrana têm como diâmetro mínimo 0,190 μm e o máximo 3,950 μm. Seu diâmetro médio é  $1,192 \pm 0,966$  μm. O EDS dessa membrana apresenta todos os íons de interesse ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Sr}^{2+}$ ). A presença desses íons nesses resultados pode estar ligada a formação de SrAp na superfície do material, pois os cristais de apatita podem atuar como pontos de nucleação, o que pode acarretar na precipitação dos demais íons presentes na solução de m-SBF sobre a superfície da matriz polimérica (DUARTE *et al.*, 2015).

A Figura 10 (c.1. e c.2.) representa a membrana de AC após imersão na solução de m-SBF por 14 dias (AC14dSrAp) para mineralização de SrAp em sua superfície. Ao analisar as imagens obtidas pode-se notar uma morfologia completamente diferente das demais já vistas, o que se dá pela presença de grandes conglomerados de cristais pertencentes à SrAp e aos demais compostos presentes na solução de m-SBF, os quais chegam a deformar a membrana, perdendo a profundidade observada nos poros nas membranas anteriores. De acordo com a Figura 11 (AC14dSrAp), nota-se que houve uma grande frequência de poros com diâmetro médio de  $1,153 \pm 0,656 \mu\text{m}$ . Das membranas analisadas, a AC14dSrAp, foi a que apresentou uma menor variação de diâmetro de poros, onde o mínimo foi  $0,188 \mu\text{m}$  e o máximo foi  $3,568 \mu\text{m}$ , ou seja, a mineralização de SrAp por 14 dias foi a condição em que se obteve uma membrana com distribuição de diâmetro de poros mais homogênea. O EDS dessa membrana constatou a presença dos íons de interesse presentes na solução de m-SBF, com exceção do Mg, o que pode se dar por inúmeros motivos, como a interferência dos demais íons presentes na solução de m-SBF.

A Figura 12 (a.1. e a.2.) representa a membrana de CB, apresentando uma estrutura fibrosa bem definida, porém, irregular, como já foi observado por outros autores (ZHANG *et al.*, 2020).



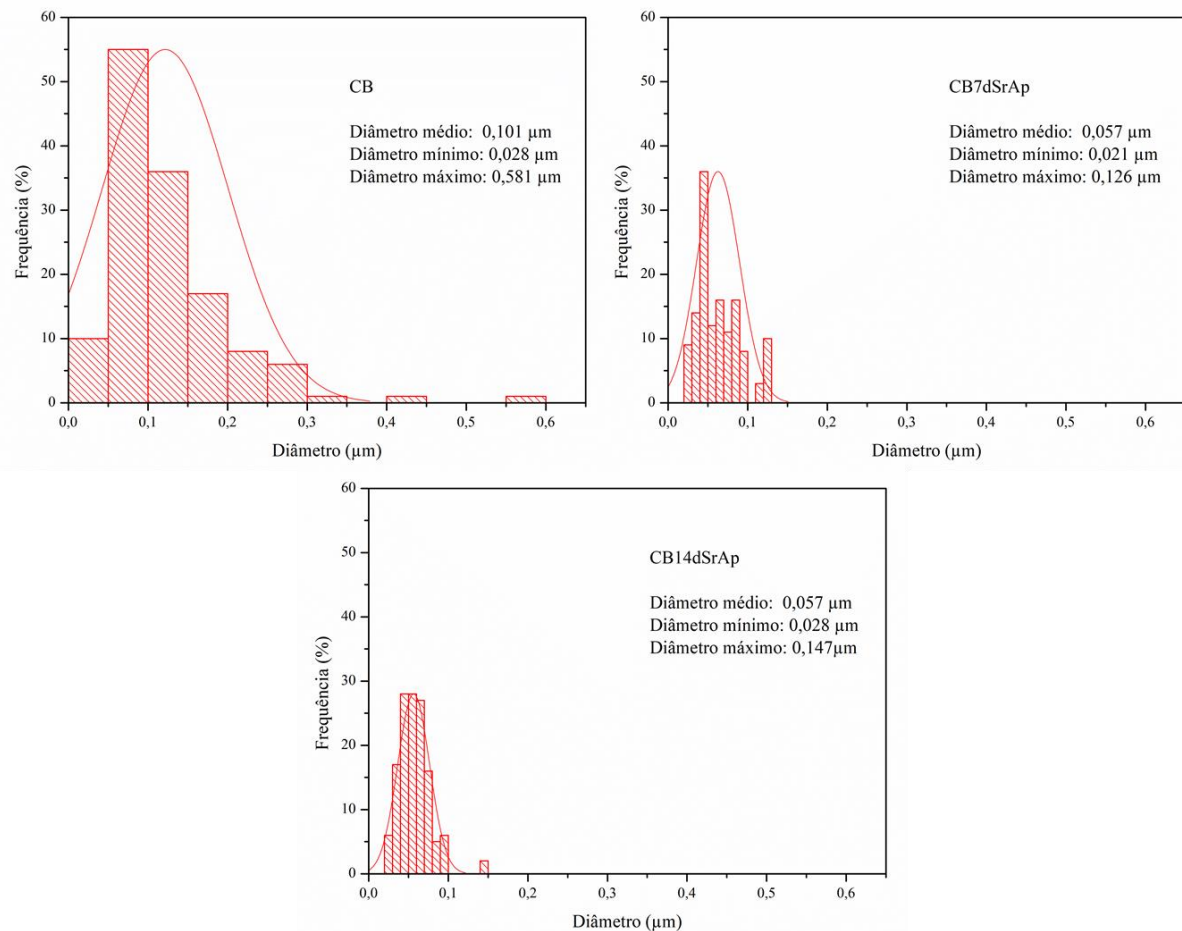
Figura 12 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies de CB (a.1. e a.2.), CB7dSrAp (b.1. e b.2.) e CB14dSrAp (c.1. e c.2.) e suas respectivas espectroscopias por energia dispersiva (EDS).



Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 13 (CB) representa a distribuição de diâmetro de fibras das membranas estudadas, e pode-se observar com as colunas representativas de CB, que essa membrana apresenta uma grande variação em seu diâmetro de fibras, o que já era de se esperar observando a Figura 12 (a.1. e a.2.). Essa membrana tem como diâmetro de poros mínimo 0,028 µm e máximo 0,581 µm. Seu diâmetro médio é  $0,101 \pm 0,079$  µm. Em seu respectivo EDS, pode-se observar que elevações em faixas relacionadas a íons de interesse presentes na solução de m-SBF ( $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$ ), o que pode ocorrer por eventuais resquícios de seu processo de produção.

Figura 13 – Distribuição de diâmetro de fibras das membranas de CB, CB7dSrAp e CB14dSrAp, e suas respectivas curvas de distribuição normal.



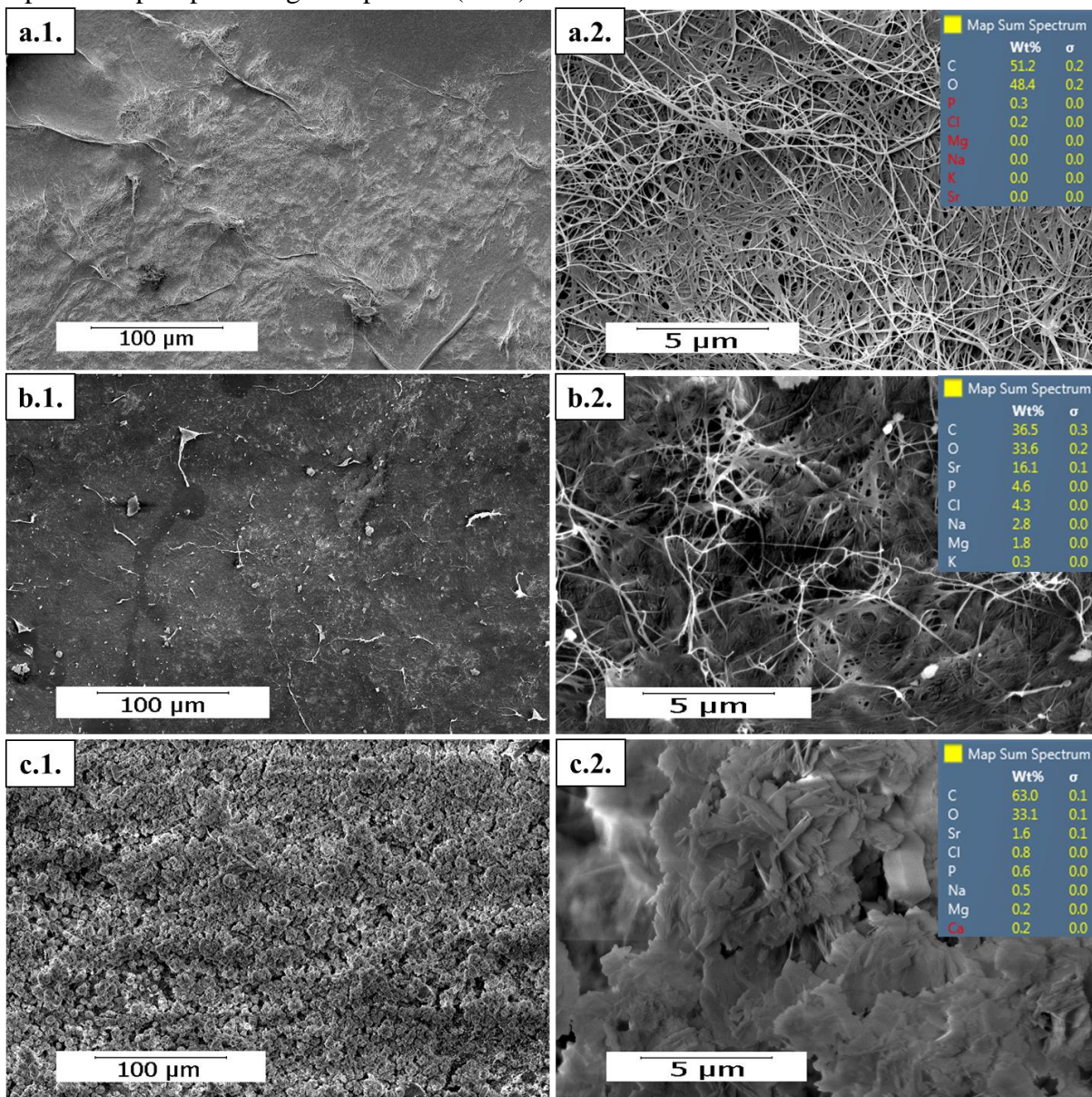
Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 12 (b.1., b.2., c.1. e c.2.) representa as membranas de CB após imersão na solução de m-SBF por 7 (CB7dSrAp) e 14 dias (CB14dSrAp) para mineralização de SrAp em sua superfície. As membranas exibiram uma morfologia totalmente diferente da observada anteriormente, suas estruturas foram deformadas pela deposição do fosfato de estrôncio em sua superfície, deixando quase imperceptível a visualização de suas fibras (OLYVEIRA *et al.*, 2017). Pode-se observar ainda, em locais isolados para a CB7dSrAp e em todo a área da CB14dSrAp, a presença de pequenos cristais pertencentes a esse fosfato. De acordo com a Figura 13, pode-se notar que a distribuição de diâmetros das fibras torna-se cada vez mais concentrada, exibindo um menor desvio padrão, assim como foi observado no caso dos poros do AC. As médias dos diâmetros das fibras das membranas de CB7dSrAp e CB14dSrAp foram  $0,057 \pm 0,027 \mu\text{m}$  e  $0,057 \pm 0,020 \mu\text{m}$ , respectivamente. Seguindo a mesma ordem, pode-se observar ainda que o diâmetro mínimo de suas fibras é de  $0,021 \mu\text{m}$  e mínimo  $0,028 \mu\text{m}$ , enquanto seu máximo é  $0,126 \mu\text{m}$  e  $0,147 \mu\text{m}$ . O EDS dessas membranas apresenta íons de

interesse ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , e  $\text{Sr}^{2+}$ ) com exceção do  $\text{K}^+$  e do  $\text{Mg}^{2+}$ . Assim como foi visto no caso das membranas de AC, a presença desses íons pode resultar da formação de SrAp na superfície do material (DUARTE *et al.*, 2015).

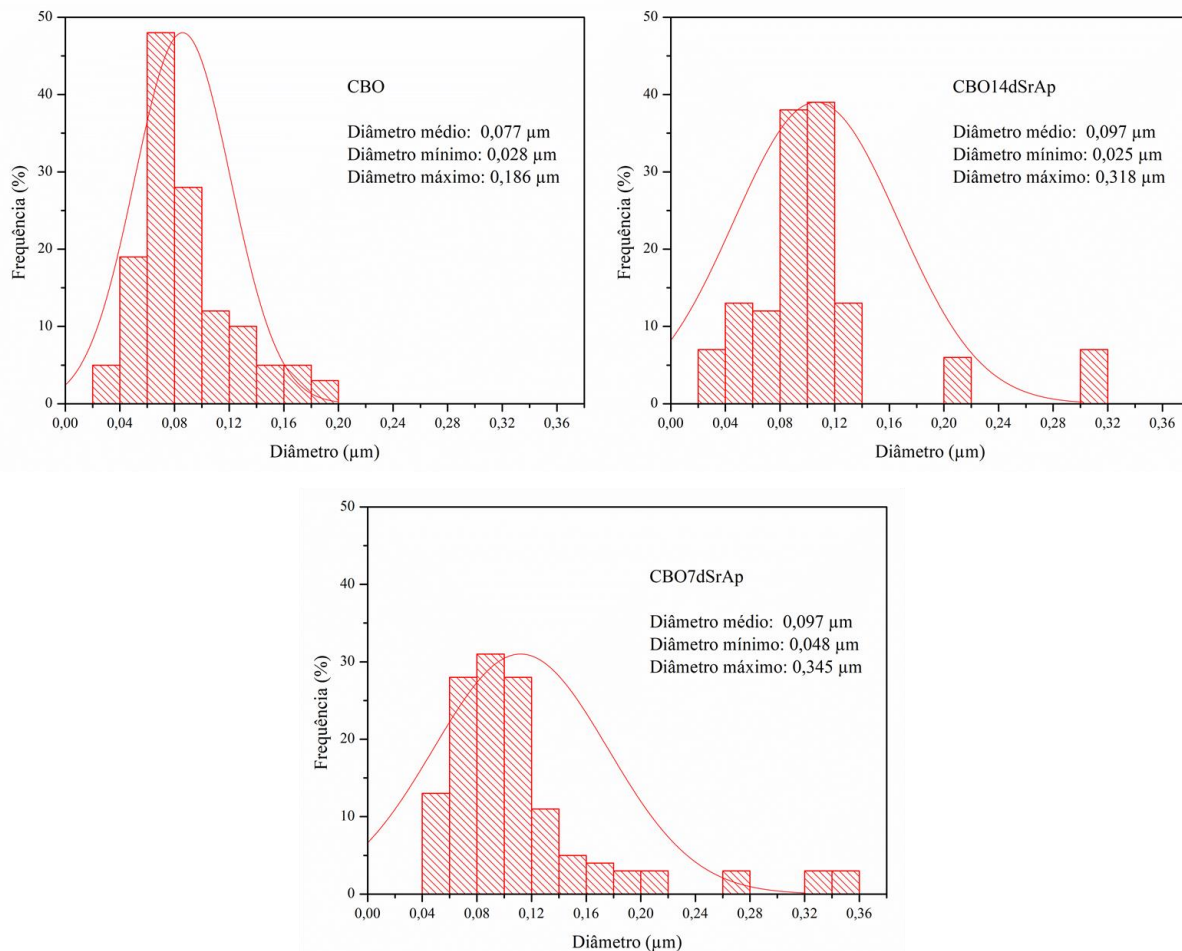
A Figura 14 (a.1. e a.2.) representa a membrana de CBO sem tratamento com a solução de m-SBF. Pode-se perceber a presença de muitas fibras, porém, quando comparada com a membrana de CB, presente na Figura 12 (a.1. e a.2.), nota-se uma deformação em sua estrutura, uma espécie de compactação. Esse fato se dá por conta da oxidação do material, o qual, como foi observado em estudos anteriores já citados nesse trabalho (VASCONCELOS, 2019), sofre uma degradação decorrente da própria reação de oxidação, podendo tornar-se mais severa caso não se utilize condições ótimas de funcionamento. A Figura 15 representa a distribuição de diâmetro de fibras das membranas estudadas, e pode-se observar com as colunas representativas de CBO, que essa membrana apresenta uma grande variação em seu diâmetro de fibras, o que já era de se esperar observando a Figura 14 (a.1. e a.2.). Essa membrana possui fibras com menor diâmetro, sendo seu mínimo  $0,028 \mu\text{m}$  e máximo  $0,186 \mu\text{m}$ . Seu diâmetro médio é  $0,077 \pm 0,035 \mu\text{m}$ . Assim como para o AC, não houve elevações em íons de interesse dessa pesquisa, validando o método de purificação utilizado nesse processo.

Figura 14 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies de CBO (a.1. e a.2.), CBO7dSrAp (b.1. e b.2.) e CBO14dSrAp (c.1. e c.2.) e suas respectivas espectroscopias por energia dispersiva (EDS).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 15 - Distribuição de diâmetro de fibras das membranas de CBO, CBO7dSrAp e CBO14dSrAp, e suas respectivas curvas de distribuição normal.



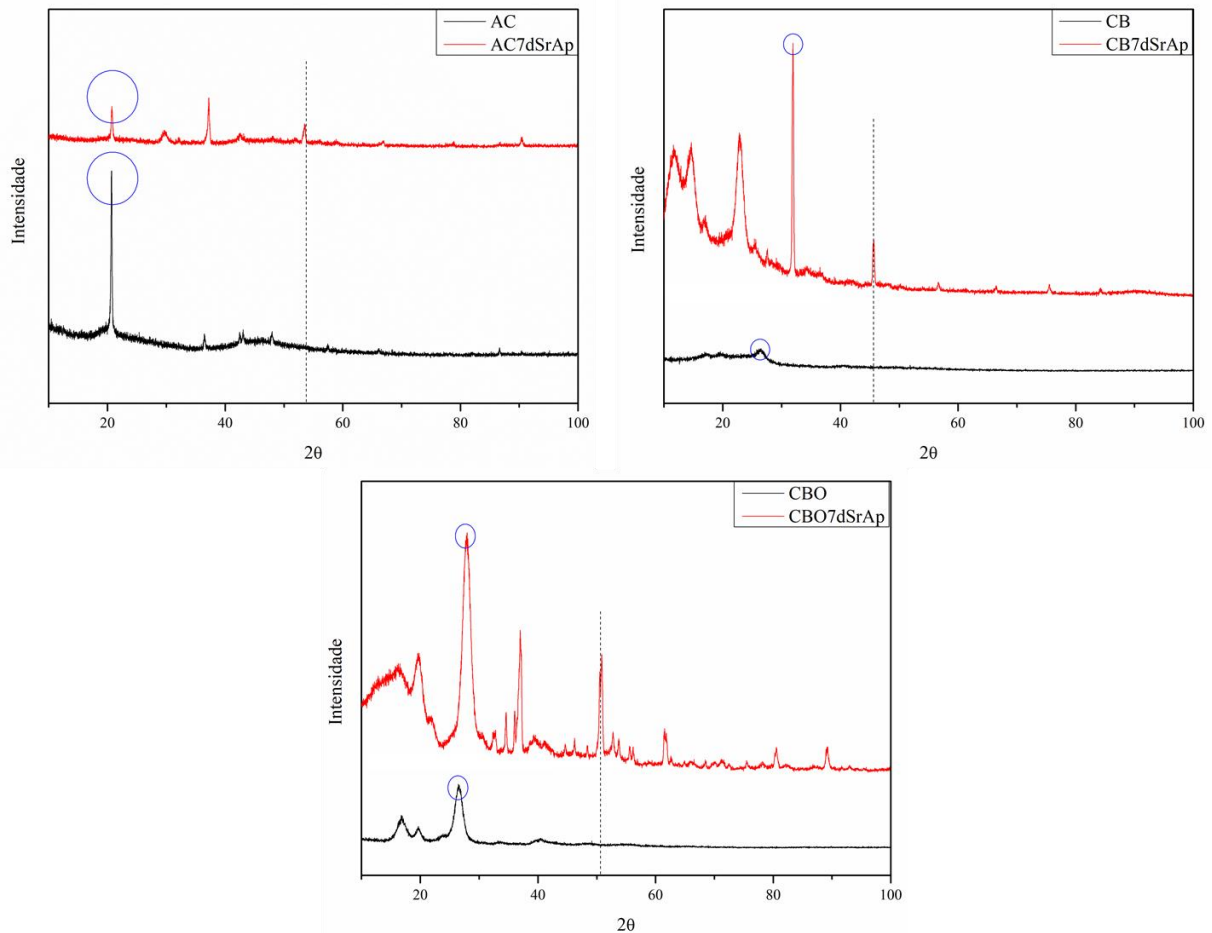
Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 14 (b.1., b.2., c.1. e c.2.) representa as membranas de CBO após imersão na solução de m-SBF por 7 (CBO7dSrAp) e 14 dias (CBO14dSrAp) para mineralização de SrAp em sua superfície. Pode-se observar que há um aumento crescente na deposição de SrAp no material, provocando deformações em sua estrutura, sendo a presença de fibras quase imperceptível na membrana de CBO14dSr. De acordo com a Figura 15, pode-se notar que a distribuição de diâmetros das fibras torna-se muito semelhante. As médias dos diâmetros das fibras das membranas de CBO7dSrAp e CBO14dSrAp foram  $0,097 \pm 0,064 \mu\text{m}$  e  $0,097 \pm 0,060 \mu\text{m}$ , respectivamente. Seguindo a mesma ordem, pode-se observar ainda que o diâmetro mínimo de suas fibras é de  $0,048 \mu\text{m}$  e mínimo  $0,025 \mu\text{m}$ , enquanto seu máximo é  $0,345 \mu\text{m}$   $0,318 \mu\text{m}$ . O EDS dessas membranas apresenta os íons de interesse.

## 5.5. Difração de raios X (DRX)

Essa análise foi realizada com o intuito de averiguar a diferença na cristalinidade dos materiais produzidos causada pela presença da SrAp. Como foi visto anteriormente, a biomineralização de SrAp por 14 dias não apresentou diferenças positivas na produção do biomaterial, sendo assim, não há a necessidade de realizar a análise com esse material. Então os difratogramas de raios-X das amostras de interesse foram compilados na Figura 16.

Figura 16 – Padrões de difração de raios X das membranas de acetato de celulose (AC), celulose bacteriana (CB) e celulose bacteriana oxidada (CBO), antes e após a imersão em m-SBF por 7 dias.



Fonte: Elaborada pela autora.

Podemos observar analisando essa imagem, que os resultados mostram clara diferença na cristalinidade entre os espectros puros e após a mineralização com SrAp em sua

superfície. Liu *et al.* (2019), Freitas *et al.* (2017) e Ahmed *et al.* (2020) constataram, e é possível de ser observado na imagem, que um dos picos característicos da estrutura semicristalina do AC é em torno 20°. Ao estudar os padrões obtidos para as amostras de CB e CBO puras, nota-se a presença de picos em torno de 16, 26 e 18°, que, como foi observado por Luz *et al.* (2020) e Motalebi Moghanjoui *et al.* (2020), os dois primeiros correspondem a presença de celulose tipo I e o último à celulose amorfa.

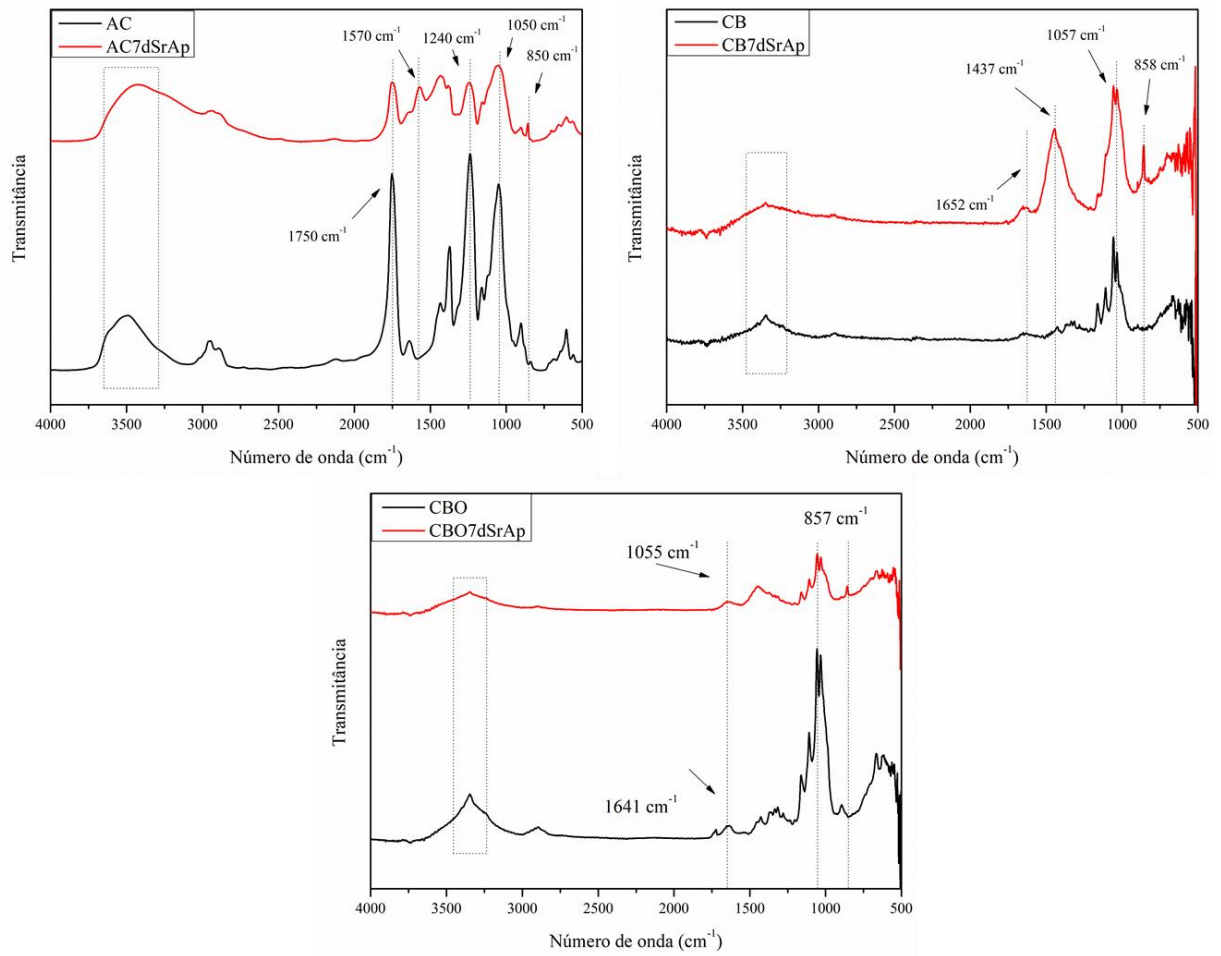
Quando analisamos os espectros referentes aos materiais biomineralizados com m-SBF, pode-se observar uma leve diminuição de intensidade nos picos padrões desses polímeros, acompanhada do aparecimento de alguns novos picos. Entre eles, picos em torno de 29,6°, 32,1°, 37,2°, 42,5°, 53,5°, os quais foram observados também por outros autores (Luz *et al.*, 2020; Ozeki *et al.*, 2013) e correspondem à presença de cristais de SrAp na membrana. Esse fato pode ser comprovado ainda pelo estudo desenvolvido por Al-Wafi *et al.* (2017), onde obtiveram difratogramas de raios-X para várias concentrações de fosfatos de estrôncio e foram apresentados picos semelhantes aos observados nesse estudo.

Com o cálculo do índice de cristalinidade foi possível observar que, mesmo com o surgimento de novas bandas no gráfico, não houve uma diferença significativa nesse índice. Nota-se uma redução de 87,56 % para 85,36 % para as membranas de AC antes e após biomineralização da SrAp, leva ao surgimento de uma fase anamórfica, fazendo com que o material apresente uma maior desorganização das cadeias, diminuindo sua cristalinidade. Os valores obtidos mostraram-se ainda, muito superiores aos encontrados na literatura, que estão na faixa de 20 - 30 % (BATTISTI *et al.*, 2019; FREITAS; SENNA; BOTARO, 2017). Os demais materiais seguem a mesmo comportamento. O índice de cristalinidade para as amostras de CB e CB7dSrAp foram, respectivamente, 78% e 74%. Já para CBO e CBO7dSrAp, o seu índice decaiu de 71% para 69%.

## **5.6. Espectroscopia com absorção na região infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

A Figura 17 representa os espectros vibracionais das membranas estudadas, puras e após incorporação da SrAp em 7 dias, e a Tabela 6 apresenta esses dados compilados, a fim de facilitar o entendimento dos dados levantados.

Figura 17 – Espectros de FTIR das membranas de acetato de celulose (AC), celulose bacteriana (CB) e celulose bacteriana oxidada (CBO), antes e após imobilização de SrAp.



Fonte: Elaborada pela autora.



Tabela 6 – Posições dos modos vibracionais dos espectros de FTIR referentes às membranas de acetato de celulose (AC), celulose bacteriana (CB) e celulose bacteriana oxidada (CBO), antes e após mineralização de SrAp.

Membrana	Grupos funcionais e posições dos modos vibracionais em cm <sup>-1</sup>						
	v (OH)	v (CH <sub>2</sub> )	v (C=O)	δ (CH <sub>2</sub> )	δ (CH <sub>3</sub> )	v (C–O)	v (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )
AC	3471	2947 <sup>AS</sup> 2893 <sup>S</sup>	1753 -	1434	1372	1236 1051	-
AC7dSrAp	3426	2940 <sup>AS</sup> 2898 <sup>S</sup>	1750 1570 <sup>AS</sup>	1433	1382	1242 1052	857
CB	3346	2915 <sup>AS</sup> 2886 <sup>S</sup>	1652 -	-	-	1057	-
CB7dSrAp	3348	1917 <sup>AS</sup> 1899 <sup>S</sup>	1653 -	1446	-	1057	858
CBO	3346	2961 <sup>AS</sup> 2895 <sup>S</sup>	1641 -	1428	-	1056	-
CBO7dSrAp	3349	2918 <sup>AS</sup> 2897 <sup>S</sup>	1637 -	1446	-	1055	857

v: corresponde ao estiramento

AS: assimétrico e

S: simétrico

δ: deformação

Fonte: Elaborada pela autora.

A banda vibracional que aparece entre 3300 e 3500 cm<sup>-1</sup> está presente em todas as amostras, pois refere-se ao estiramento do grupo hidroxila (O–H), o qual está presente na estrutura química dos polímeros estudados por possuírem a estrutura celulósica. Além disso, as membranas apresentam bandas vibracionais comuns entre os polímeros, os quais estão próximos às faixas de 2940 e 2900 cm<sup>-1</sup>, relacionados aos estiramentos CH<sub>2</sub> assimétrico e simétrico, respectivamente. A banda próxima à 1750 cm<sup>-1</sup>, observado no espectro referente ao AC, é bastante intenso e representa o estiramento C=O (carbonila), referente ao grupo éster presente em sua composição (FREITAS; SENNA; BOTARO, 2017). Os picos próximos a 1240

e  $1050\text{ cm}^{-1}$  representam o estiramento de ligação simples C–O, sendo essa primeira visualizada nas membranas de AC, por referir-se a estrutura do acetato (TOPRAK; AGAR; FALK, 1979). Além das bandas expressas anteriormente, em todas as membranas, foi possível observar a presença da banda próxima a  $1435\text{ cm}^{-1}$  e para as membranas de AC, a banda  $1375\text{ cm}^{-1}$ , que representam a deformação angular de  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente.

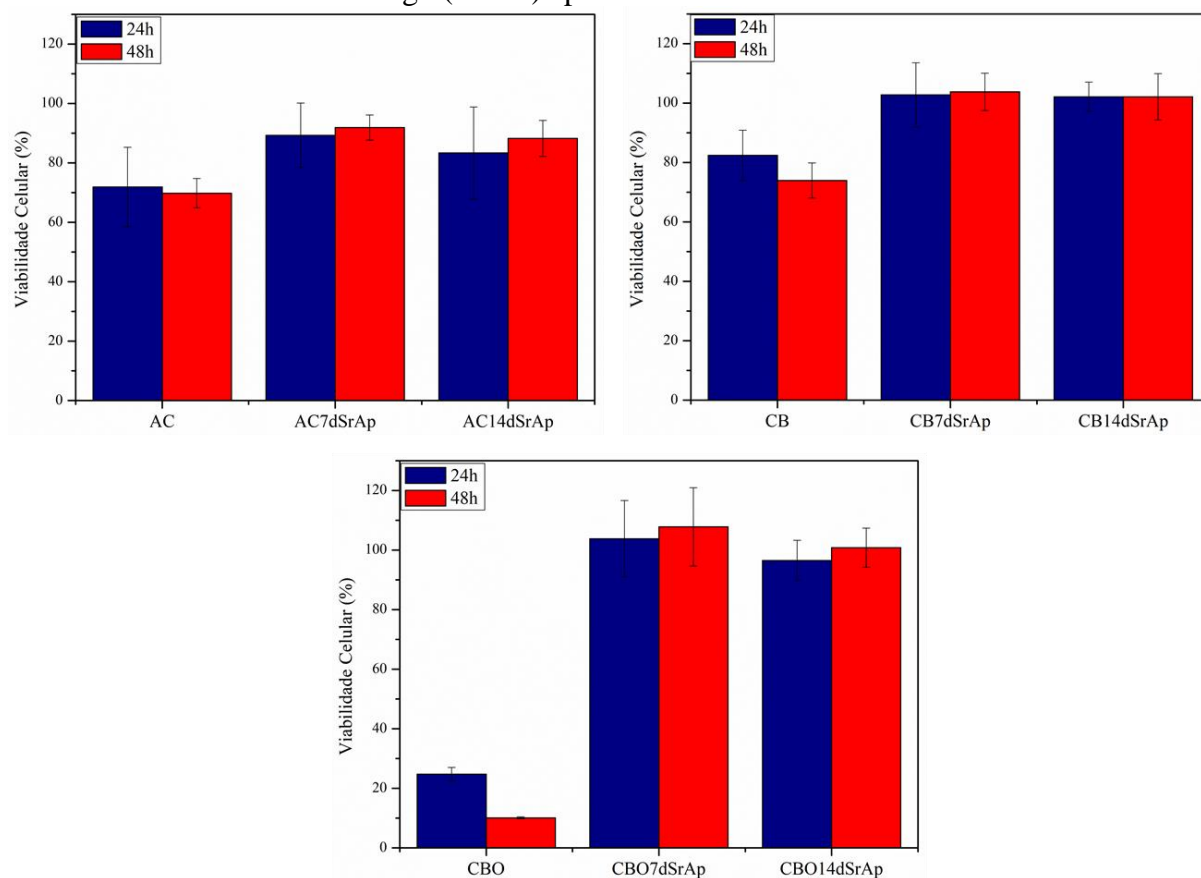
Ainda estudando a Figura 17, observam-se bandas que indicam as mudanças causadas pela mineralização da SrAp na superfície desses materiais. A amostra de AC7dSrAp, além dos espectros característicos da membrana de AC, apresentara o surgimento de picos na faixa de  $850$  e  $1570\text{ cm}^{-1}$ , os quais referem-se, respectivamente, ao alongamento do grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (ABDELGHANY *et al.*, 2018) e ao alongamento assimétrico C=O referente ao grupo carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) (HENRY; WATSON; JOHN, 2017). Já as amostras de CB e CBO mineralizadas com SrAp apresentam apenas o primeiro ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Esses dois picos estão diretamente relacionados com a presença de  $\text{Sr}^{2+}$  nessas membranas, indicando então a presença de Ap e SrAp carbonatados (AL-WAFI *et al.*, 2017).

## 5.7. Ensaio de citotoxicidade

As membranas produzidas nesse estudo devem atuar como *scaffolds* que simulem a matriz extracelular do tecido ósseo. Sendo assim, elas devem apresentar, osteopromoção, guiando a regeneração óssea e mantendo os tecidos indesejáveis não osteogênicos fora do local da osteogênese (CALCIOLARI; AKCALI; DONOS, 2020). É de fundamental importância que, além de estudar o comportamento de citotoxicidade dessas membranas com células osteoprogenitoras como os osteoblastos, seja estudada também a citotoxicidade em contato com células de fibroblastos, sendo essas presentes em tecidos conjuntivos e detentoras de funções como a síntese de proteínas e substâncias da matriz extracelular, induzindo cicatrizações.

A Figura 18 apresenta os resultados de citotoxicidade das membranas estudadas em contato com fibroblastos de camundongo (L-929), os quais proporcionaram resultados bastante satisfatórios.

Figura 18 – Citotoxicidade das membranas de acetato de celulose (AC), celulose bacteriana (CB) e celulose bacteriana oxidada (CBO), antes e após a mineralização de SrAp, em contato com fibroblastos de camundongo (L-929) após 24h e 48h.



Fonte: Elaborada pela autora.

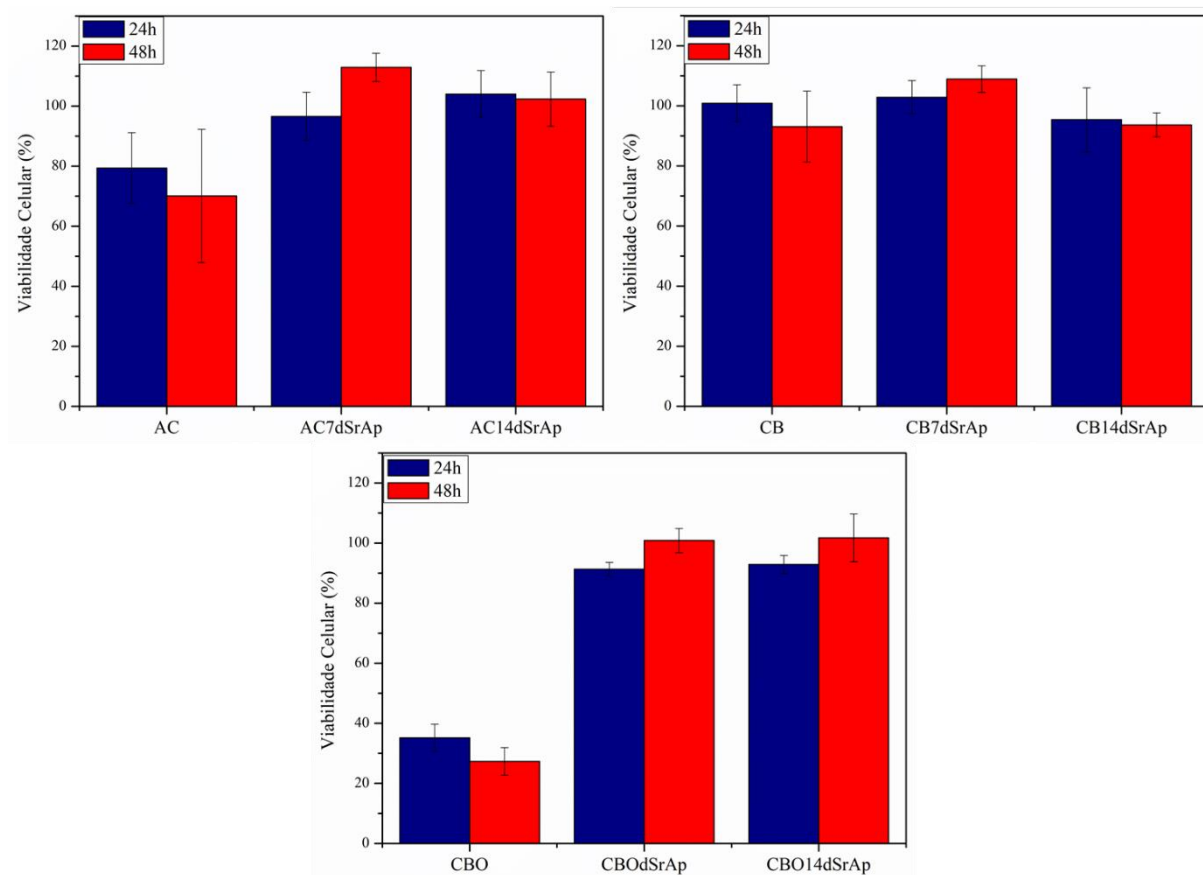
Todas as amostras produzidas foram testadas, com o intuito de identificar se o tempo de imersão em m-SBF apresentaria diferenças significativas em relação a viabilidade dessas células. Após a incubação nos extratos de AC, AC7dSrAp e AC14dSrAp por 24h, o percentual de sobrevivência dessa linhagem celular foi de  $71,92 \pm 13,35 \%$ ,  $89,29 \pm 10,86\%$  e  $83,32 \pm 15,53 \%$ , respectivamente. Embora todos os valores tenham ficado abaixo de 100%, somente a primeira apresentou um efeito citotóxico. Após 48h, foi possível observar, como já havia sido reportado na literatura (TOPEL *et al.*, 2021), uma leve diminuição na viabilidade das células em contato com o extrato de AC, a qual diminuiu para  $69,79 \pm 4,92 \%$ , e um aumento nas que estiveram em contato com os extratos das membranas mineralizadas com SrAp, sendo para AC7dSrAp e AC14dSrAp obtidos valores de viabilidade de  $91,89 \pm 4,25 \%$  e  $88,23 \pm 6,05 \%$ , respectivamente.

Resultados semelhantes aos observados anteriormente também foram obtidos para os extratos de CB e CBO. Em 24 h de incubação, as membranas obtiveram  $82,38 \pm 8,47 \%$  e  $24,76 \pm 2,27\%$ , respectivamente. Em 48 h, houve ainda uma diminuição em sua viabilidade,  $73,96 \pm 5,92 \%$  e  $10,12 \pm 0,31 \%$ , respectivamente. A CBO apresentou um resultado extremamente citotóxico, o qual pode ser explicado pela possível degradação dessa membrana ou até mesmo pela presença de grupos reativos em sua superfície. Embora a degradabilidade do implante seja uma característica interessante e desejável, esse processo também pode estar associado a esse aumento de toxicidade, pois pode liberar produtos ácidos, como o ácido butírico e o ácido acético, os quais proporcionam uma diminuição no pH do meio e consequentemente da viabilidade celular, como foi relatado anteriormente por Luz *et al.* (2020).

As membranas funcionalizadas com SrAp, obtiveram elevada viabilidade celular, sendo obtidos para BC7dSrAp, BC14dSrAp, BCO7dSrAp e BCO14dSrAp valores de  $102,76 \pm 10,83 \%$ ,  $102,13 \pm 4,93 \%$ ,  $103,8 \pm 12,81 \%$  e  $96,5 \pm 6,74 \%$ , respectivamente. Com 48 h esses valores passaram para  $103,78 \pm 6,28 \%$ ,  $102,12 \pm 7,82\%$ ,  $107,79 \pm 13,11 \%$  e  $100,8 \pm 6,58 \%$ . Existem duas explicações possíveis para esse efeito. O efeito da SrAp na redução da solubilidade, e consequentemente, na degradação do material, e a precipitação dos sais presentes no m-SBF neutralizarem possíveis grupos reativos presentes na superfície desses materiais.

A Figura 19 apresenta os resultados de citotoxicidade das membranas estudadas em contato com osteoblastos de camundongo (MC3T3-E1 Subclone 14), os quais proporcionaram resultados ainda mais satisfatórios que os analisados anteriormente.

Figura 19 – Citotoxicidade das membranas de acetato de celulose (AC), celulose bacteriana (CB) e celulose bacteriana oxidada (CBO), antes e após a mineralização de SrAp, em contato com osteoblastos de camundongo (MC3T3-E1 Subclone 14) após 24h e 48h.



Fonte: Elaborada pela autora.

Pode-se observar que, para todas as membranas puras (AC, CB e CBO) é apresentado um comportamento de viabilidade decrescente ao decorrer dos dias de teste, o que condiz com os resultados obtidos para os fibroblastos. Com as amostras biomineralizadas com SrAp observa-se um comportamento semelhante, onde mais uma vez não é possível observar diferenças significativas entre as imersas por 7 e 14 dias em m-SBF (GAŠPARIČ *et al.*, 2017; INGOLE *et al.*, 2019; MA; LIU; ZHU, 2018), e prova a hipótese de partida desse trabalho, que a presença da apatita de estrôncio induz um aumento em sua viabilidade celular, pois ele aumenta a formação óssea *in vivo* através da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, a qual regula diversos fenômenos, entre eles os relacionados à diferenciação, polarização e migração celular (Yang *et al.*, 2011).

## 6. RESUMO DOS RESULTADOS

- As membranas de celulose bacteriana, celulose bacteriana oxidada e acetado de celulose, foram produzidas seguindo condições ideais pré-estabelecidas, e embora tenham apresentado morfologias distintas, pode-se observar que em todas, se torna evidente a presença de uma estrutura porosa;
- O inchaço apresentado pelas membranas ao imergirem em água comprovaram sua hidrofiliçidade, resultado das ligações de hidrogênio formadas entre as moléculas de água e os grupos hidrofílicos presentes nas membranas;
- O teste de bioatividade foi feito de forma a realizar uma comparação com os resultados observados no teste de intumescimento. As membranas em imersão na solução de SBF, aumentaram sua capacidade de absorção de líquidos, resultado da ionização de grupos carboxilatos devido à maior concentração de constituintes polares, como íons metálicos provenientes da solução de SBF que levaram a um aumento na pressão osmótica entre a membrana e o solvente. Com a junção desse fator à presença de grupos hidrofílicos na estrutura dessas membranas, além das ligações de hidrogênio, são criadas interações eletrostáticas e de Van der Waals na interface líquido-sólido e, de acordo com as propriedades eletrônicas dos cátions em SBF, a interação entre elas pode ser favorecida. Deve ser ressaltado que, não houve a deposição imediata da SrAp na estrutura do material;
- O método de incorporação da SrAp nas membranas estudadas foi eficaz, resultando em materiais estáveis.
- A incorporação de SrAp nas membranas estudadas se deu pela deposição de íons  $\text{Sr}^{2+}$  e fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) nessas membranas, formando assim fosfatos de estrôncio com interações intramoleculares do tipo iônica. A celulose conta com uma grande quantidade de grupos hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) livres em sua superfície, favorecendo assim a ligação iônica entre esse grupo de carga negativa e o  $\text{Sr}^{2+}$  que conta com carga positiva;
- A quantidade máxima de Sr incorporada nas membranas se dá nos 7 primeiros dias de imersão em m-SBF;
- As micrografias obtidas mostraram que houve uma deformação na estrutura das membranas ao serem biomineralizadas com SrAp, o que afetou diretamente os resultados de DRX, os quais apresentaram uma diminuição em sua cristalinidade, proveniente da maior desorganização das cadeias.

- O FTIR ressaltou a presença da SrAp nas membranas biomineralizadas ao apresentar as bandas vibracionais referentes ao alongamento do grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e ao alongamento assimétrico C=O referente ao grupo carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), indicando a presença de Ap e SrAp carbonatada.
- O ensaio de citotoxicidade confirmou que a presença da apatita de estrôncio induz um aumento em sua viabilidade celular, pois ele aumenta a formação óssea *in vivo* através da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, a qual regula diversos fenômenos, entre eles os relacionados à diferenciação, polarização e migração celular. A CBO apresentou um resultado surpreendente. Inicialmente, sem tratamento, apresentou um resultado extremamente citotóxico, podendo ser explicado pela possível degradação dessa membrana ou até mesmo pela presença de grupos reativos em sua superfície. Já com a adição de SrAp em sua estrutura, houve um grande aumento de sua viabilidade celular, podendo ser explicado pelo efeito da SrAp na redução da solubilidade, e conseqüentemente, na degradação do material, e a precipitação dos sais presentes no m-SBF neutralizarem possíveis grupos reativos presentes na superfície desses materiais.

## 7. CONCLUSÕES

As membranas de interesse desse estudo foram produzidas e caracterizadas, demonstrando que, o método utilizado para a mineralização de SrAp se mostrou muito eficaz, o que foi comprovado pela identificação desse metal e desse fosfato na realização das caracterizações químicas e morfológicas. O estudo de viabilidade pode provar que, a mineralização de SrAp durante 7 dias apresenta melhores resultados em todas as membranas, com grande destaque para a membrana de CBO, que se equiparou aos resultados de viabilidade apresentados pelo AC comercial, e mostrou-se bastante promissora, pois resulta na possibilidade de criar um biomaterial com ótimas propriedades osteoprogenitoras e que apresente degradação controlada, pois à medida que a SrAp cumpre seu papel osteogênico, o material irá degradando-se sem afetar significativamente o meio em que se está inserido.



## **8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Avaliar a citotoxicidade dos materiais utilizando testes que avaliem vários aspectos do comportamento das células quando cultivadas na presença dos scaffolds produzidos;
- Utilizar o conhecimento adquirido com esse estudo para ampliar as aplicações desse biomaterial;
- Avaliar a degradação desse biomaterial.

## **9. TRABALHOS PUBLICADOS E EM PRODUÇÃO**

- Biomimetic Strontium Substituted Calcium Phosphate Coating for Bone Regeneration (Publicado pela revista: Coatings).
- Biomineralized oxidized bacterial cellulose with strontium apatite for bone regeneration (Em fase de escrita).

## REFERÊNCIAS

ABDELGHANY, A. M. *et al.* Optical and FTIR structural studies on CoO-doped strontium phosphate glasses. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 499, n. May, p. 153–158, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.07.022>

ABOAMERA, Nada M. *et al.* Characterization and mechanical properties of electrospun cellulose acetate/graphene oxide composite nanofibers. **Mechanics of Advanced Materials and Structures**, v. 26, n. 9, p. 765–769, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15376494.2017.1410914>

AHANGARI, M.; JOHAR, M. H.; SAREMI, M. Hydroxyapatite-carboxymethyl cellulose-graphene composite coating development on AZ31 magnesium alloy: Corrosion behavior and mechanical properties. **Ceramics International**, v. 47, n. 3, p. 3529–3539, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.09.197>

AHMED, M.K.; MENAZEA, A.A.; ABDELGHANY, A.M. Blend biopolymeric nanofibrous scaffolds of cellulose acetate/ $\epsilon$ -polycaprolactone containing metallic nanoparticles prepared by laser ablation for wound disinfection applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 155, p. 636–644, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.257>

AL-WAFI, Reem *et al.* Fast and easy synthesis of novel Strontium apatite nanostructured phase: Structure, spectroscopy, and dielectric analysis. **Ceramics International**, v. 43, n. 18, p. 17153–17159, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.09.137>

AN, J *et al.* Mineralization processes in hard tissue: Bone 4. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-338-6.00005-3>

ANASTASIOU, A. D. *et al.* Antibacterial properties and regenerative potential of Sr<sup>2+</sup> and Ce<sup>3+</sup> doped fluorapatites; a potential solution for peri-implantitis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50916-4>

BARUD, H. G. Oliveira *et al.* Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 41–51, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.007>

BATTISTI, Rodrigo *et al.* Synthesis and characterization of cellulose acetate from royal palm tree agroindustrial waste. **Polymer Engineering & Science**, v. 59, n. 5, p. 891–898, 2019.

Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pen.25034>

BISWAS, Atanu *et al.* Process for obtaining cellulose acetate from agricultural by-products. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 1, p. 134–137, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.11.002>

BLACK, Cameron R. M. *et al.* Bone Tissue Engineering. **Current Molecular Biology Reports**, v. 1, n. 3, p. 132–140, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40610-015-0022-2>

BOHNER, Marc; LEMAITRE, Jacques. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? **Biomaterials**, v. 30, n. 12, p. 2175–2179, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.008>

BUCK, Donald W.; DUMANIAN, Gregory A. Bone biology and physiology: Part I. the fundamentals. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 129, n. 6, p. 1314–1320, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31824eca94>

CACICEDO, Maximiliano L. *et al.* Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 172–180, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.071>

CALCIOLARI, Elena; AKCALI, Aliye; DONOS, Nikolaos. The Role of Osteopromotive Membranes in Guided Bone Regeneration. *In: BONE AUGMENTATION BY ANATOMICAL REGION*. Wiley, 2020. p. 69–93. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119427926.ch5>

CHEN, Qizhi; THOUAS, George. **Biomaterials: A Basic Introduction**. CRC Press, 2014.

COCHIS, Andrea *et al.* Competitive surface colonization of antibacterial and bioactive materials doped with strontium and/or silver ions. **Nanomaterials**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nano10010120>

DUARTE, Eden B. *et al.* Production of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites from agroindustrial wastes. **Cellulose**, v. 22, n. 5, p. 3177–3187, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0734-8>

FRAGAL, Elizângela H. *et al.* Biomimetic nanocomposite based on hydroxyapatite mineralization over chemically modified cellulose nanowhiskers: An active platform for osteoblast proliferation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 133–

142, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.004>

FRASNELLI, Matteo *et al.* Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 653–662, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.047>

FREITAS, Roberta R.M. de; SENNA, André M.; BOTARO, Vagner R. Influence of degree of substitution on thermal dynamic mechanical and physicochemical properties of cellulose acetate. **Industrial Crops and Products**, v. 109, n. June, p. 452–458, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.062>

GALDINO, Claudio J.S. *et al.* Evaluation of the potential of bacterial cellulose in the treatment of oily waters. **Chemical Engineering Transactions**, v. 74, n. March, p. 313–318, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3303/CET1974053>

GAŠPARIČ, Petra *et al.* Nanofibrous polysaccharide hydroxyapatite composites with biocompatibility against human osteoblasts. **Carbohydrate Polymers**, v. 177, p. 388–396, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.111>

GATENHOLM, Paul; RENNECKAR, Scott. Electrospinning cellulosic nanofibers for biomedical applications: structure and in vitro biocompatibility. p. 1583–1598, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9734-0>

GOUMA, P *et al.* Nano-hydroxyapatite — Cellulose acetate composites for growing of bone cells. v. 32, p. 607–612, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.12.019>

HENRY, Delano G.; WATSON, Jonathan S.; JOHN, Cédric M. Assessing and calibrating the ATR-FTIR approach as a carbonate rock characterization tool. **Sedimentary Geology**, v. 347, p. 36–52, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2016.07.003>

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochem J**, v. 58, n. 2, p. 345–352, 1954. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj0580345>

HORI, Shigeo; HIRANO, Minoru; OHTA, Riichiro. Electrodeposition of strontium apatite nanorod arrays and their cell compatibility. **Ceramics International**, v. 43, n. 12, p. 9047–9052, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.04.049>

HU, Chao *et al.* Bioinspired surface modification of orthopedic implants for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 219, n. February, p. 119366, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119366>

INGOLE, Vijay H. *et al.* Mechanical Properties and Cytotoxicity of Differently Structured Nanocellulose-hydroxyapatite Based Composites for Bone Regeneration Application. **Nanomaterials**, v. 10, n. 1, p. 25, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nano10010025>

ISO 10993-12. *In: BIOLOGICAL EVALUATION OF MEDICAL DEVICES - PART 12: SAMPLE PREPARATION AND REFERENCE MATERIALS.* 2012.

JACOME-GALARZA, Christian E *et al.* Developmental origin, functional maintenance and genetic rescue of osteoclasts. **Nature**, v. 568, n. 7753, p. 541–545, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1105-7>

JANICKI, Patricia; SCHMIDMAIER, Gerhard. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute ? Combining scaffolds with growth factors and / or stem cells. **Injury**, v. 42, p. S77–S81, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.014>

JIMÉNEZ, Mirta *et al.* Bibliographic review on the state of the art of strontium and zinc based regenerative therapies. Recent developments and clinical applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 12, p. 1974–1985, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c8tb02738b>

KALFAS, I. H. Principles of bone healing. **Neurosurgical focus**, v. 10, n. 4, p. 22–25, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.3171/foc.2001.10.4.2>

KE, Dongxu *et al.* Compositionally graded doped hydroxyapatite coating on titanium using laser and plasma spray deposition for bone implants. **Acta Biomaterialia**, v. 84, p. 414–423, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.041>

KIM, Ung Jin *et al.* Periodate oxidation of crystalline cellulose. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 3, p. 488–492, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bm0000337>

KINALSKI, Mateus De Azevedo *et al.* Dental implant therapy in the Brazilian Public System: an overview of the last decade. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 19, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.20396/bjos.v19i0.8660126>

KUNST, B; SOURIRAJAN, S. An Approach to the Development of Cellulose Acetate Ultrafiltration Membranes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 18, p. 3423–3434, 1974. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.1974.070181121>

LIU, Liu *et al.* Degradation markers and plasticizer loss of cellulose acetate films during ageing. **Polymer Degradation and Stability**, v. 168, p. 108952, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2019.108952>

LIU, Ying Ling *et al.* Crosslinked organic-inorganic hybrid chitosan membranes for pervaporation dehydration of isopropanol-water mixtures with a long-term stability. **Journal of Membrane Science**, v. 251, n. 1–2, p. 233–238, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.12.003>

LUCHETTI, José Roberto. **Sociedade de Ortopedia participou do lançamento do Registro Nacional de Implantes**. DOC Press, 2018. Disponível em: <http://www.pautas.incorporativa.com.br/a-mostra-release.php?id=35327>

LUO, Honglin *et al.* Characterization of TEMPO-oxidized bacterial cellulose scaffolds for tissue engineering applications. **Materials Chemistry and Physics**, v. 143, n. 1, p. 373–379, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2013.09.012>

LUZ, Erika Patricia Chagas Gomes. **Desenvolvimento de materiais híbridos à base de celulose bacteriana e/ou hidroxiapatita dopados com estrôncio**. 74 f. 2016. - Universidade Federal do Ceará, 2016.

LUZ, Erika Patricia Chagas Gomes *et al.* Resorbable bacterial cellulose membranes with strontium release for guided bone regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 116, n. June, p. 111175, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111175>

LUZ, Erika Patricia Chagas Gomes *et al.* Strontium delivery systems based on bacterial cellulose and hydroxyapatite for guided bone regeneration. **Cellulose**, v. 25, n. 11, p. 6661–6679, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2008-8>

MA, Xiaoyu; LIU, Yongjia; ZHU, Bangshang. Synthesis and characterization of pure strontium apatite particles and nanoporous scaffold prepared by dextrose-templated method. **Materials Research Express**, v. 5, n. 2, p. 025002, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aaa84c>

MEDRONHO, Bruno *et al.* Rationalizing cellulose (in)solubility: Reviewing basic physicochemical aspects and role of hydrophobic interactions. **Cellulose**, v. 19, n. 3, p. 581–587, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9644-6>

MIRANDA, G. *et al.* Surface design using laser technology for Ti6Al4V-hydroxyapatite

implants. **Optics and Laser Technology**, v. 109, n. April 2018, p. 488–495, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2018.08.034>

MOTALEBI MOGHANJOUGI, Zahra *et al.* Bio-preservation of white brined cheese (Feta) by using probiotic bacteria immobilized in bacterial cellulose: Optimization by response surface method and characterization. **LWT**, v. 117, p. 108603, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108603>

NAIDU, Nikita A; WADHER, Kamlesh; UMEKAR, Milind. An Overview on Biomaterials: Pharmaceutical and Biomedical Applications. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 11, n. 1-s, p. 154–161, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.22270/jddt.v11i1-s.4723>

NAKAMURA, Takashi *et al.* Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the osteogenic differentiation of osteoprogenitor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 524, n. 3, p. 702–709, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.136>

NANDI, B.K.; UPPALURI, R.; PURKAIT, M.K. Effects of dip coating parameters on the morphology and transport properties of cellulose acetate–ceramic composite membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 330, n. 1–2, p. 246–258, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.12.071>

O’SULLIVAN, AC C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, n. 3, p. 173–207, 1997. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1018431705579>

OLYVEIRA, Gabriel Molina de *et al.* Surface physical chemistry properties in coated bacterial cellulose membranes with calcium phosphate. **Materials Science and Engineering: C**, v. 75, p. 1359–1365, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.025>

OZEKI, K. *et al.* Phase Composition of Sputtered Film from a Mixture Target of Hydroxyapatite and Strontium-apatite. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 1–6, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2012.11.014>

PANDELE, A. M. *et al.* Synthesis and characterization of cellulose acetate-hydroxyapatite micro and nano composites membranes for water purification and biomedical applications. **Vacuum**, v. 146, p. 599–605, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2017.05.008>

PANG, Mujuan *et al.* Application of bacterial cellulose in skin and bone tissue engineering.



**European Polymer Journal**, v. 122, n. July 2019, p. 109365, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109365>

PARK, Joon B; BRONZINO, Joseph D (org.). **Biomaterials: PRINCIPLES and APPLICATIONS**. CRC PRESS, 2003.

QIU, Zhi-ye; CUI, Yun; WANG, Xiu-mei. **Natural Bone Tissue and Its Biomimetic**. Elsevier Ltd, 2019. v. 10 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102717-2.00001-1>

RAMANATHAN, Giriprasath *et al.* Fabrication of Biohybrid Cellulose Acetate-Collagen Bilayer Matrices as Nanofibrous Spongy Dressing Material for Wound-Healing Application. **Biomacromolecules**, v. 21, n. 6, p. 2512–2524, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00516>

RAN, Jiabing *et al.* Constructing multi-component organic / inorganic composite bacterial cellulose-gelatin / hydroxyapatite double-network scaffold platform for stem cell-mediated bone tissue engineering. **Materials Science & Engineering C**, v. 78, p. 130–140, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.062>

SEGAL, L. *et al.* An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786–794, 1959. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/004051755902901003>

SONI, Jamil Faissal *et al.* Análise comparativa em modelo computadorizado bidimensional com simulação do emprego de hastas flexíveis de aço e titânio, na fratura do fêmur da criança, utilizando o método dos elementos finitos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 43, n. 5, p. 183–192, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-36162008000400005>

SOUZA, Marisa Aparecida *et al.* Immobilisation of apatite on Ti30Ta alloy surface by electrospinning of PCL. **Surface Innovations**, v. 5, n. 2, p. 68–74, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1680/jsuin.16.00011>

STUMPF, Taisa Regina *et al.* In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 82, p. 372–383, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.121>

SULTANA, Naznin; BANDYOPADHYAY-GHOSH, Sanchita; SOON, Chin Fhong (org.). **Tissue Engineering Strategies for Organ Regeneration**. New York: CRC Press, 2020.

TAN, Hui Li *et al.* Electrospun cellulose acetate butyrate/polyethylene glycol (CAB/PEG)

composite nanofibers: A potential scaffold for tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 188, n. June 2019, p. 110713, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110713>

TOPEL, Seda Demirel *et al.* Cellulose acetate encapsulated upconversion nanoparticles – A novel theranostic platform. **Materials Today Communications**, v. 26, p. 101829, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101829>

TOPRAK, Chris; AGAR, John N.; FALK, Michael. State of water in cellulose acetate membranes. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases**, v. 75, n. 16774, p. 803–815, 1979. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/F19797500803>

TREESUPPHARAT, W. *et al.* Synthesis and characterization of bacterial cellulose and gelatin-based hydrogel composites for drug-delivery systems. **Biotechnology Reports**, v. 15, n. March, p. 84–91, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.07.002>

VASCONCELOS, Niédja Fittipaldi. **Desenvolvimento de curativo de Celulose Bacteriana/Papaína para tratamento de Lesões Cutâneas**. 164 f. 2019. - Universidade Federal do Ceará, 2019.

VASCONCELOS, Niédja Fittipaldi *et al.* Oxidized bacterial cellulose membrane as support for enzyme immobilization: properties and morphological features. **Cellulose**, v. 27, n. 6, p. 3055–3083, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-020-02966-5>

VISHAL GUPTA, N.; SHIVAKUMAR, H. G. Investigation of Swelling Behavior and Mechanical Properties of a pH-Sensitive Superporous Hydrogel Composite. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 2, p. 481–493, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.22037/ijpr.2012.1097>

WANG, Ying Jun *et al.* Investigations on the formation mechanism of hydroxyapatite synthesized by the solvothermal method. **Nanotechnology**, v. 17, n. 17, p. 4405–4412, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/17/020>

WEYELL, Peter *et al.* Tailor-made material characteristics of bacterial cellulose for drug delivery applications in dentistry. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, n. July 2018, p. 1–10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.061>

WINDHAGER, R.; HOBUSCH, G. M.; MATZNER, M. Allogene Transplantate für

biologische Rekonstruktionen von Knochendefekten. **Orthopade**, v. 46, n. 8, p. 656–664, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00132-017-3452-0>

WSOO, Mohammed Ahmad *et al.* A review on the properties of electrospun cellulose acetate and its application in drug delivery systems: A new perspective. **Carbohydrate Research**, v. 491, n. February, p. 107978, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.107978>

YADAV, Mithilesh. Study on thermal and mechanical properties of cellulose/iron oxide bionanocomposites film. **Composites Communications**, v. 10, p. 1–5, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coco.2018.04.010>

YANG, Fan *et al.* Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling. **Stem Cells**, v. 29, n. 6, p. 981–991, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/stem.646>

YANG, Mao *et al.* Biomimetic Design of Oxidized Bacterial Cellulose-gelatin-hydroxyapatite Nanocomposites. **Journal of Bionic Engineering**, v. 13, n. 4, p. 631–640, 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1672-6529\(16\)60334-7](https://doi.org/10.1016/S1672-6529(16)60334-7)

ZHANG, Chen *et al.* Biocompatibility evaluation of bacterial cellulose as a scaffold material for tissue-engineered corneal stroma. **Cellulose**, v. 27, n. 5, p. 2775–2784, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-020-02979-0>

ZHAO, Danlei *et al.* Improvement on mechanical properties and corrosion resistance of titanium-tantalum alloys in-situ fabricated via selective laser melting. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 804, p. 288–298, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.06.307>