

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

BIOCOMPÓSITO HÍBRIDO A BASE DE CELULOSE BACTERIANA COM
HIDROXIAPATITA PARCIALMENTE SUBSTITUÍDA POR Mg/Zn E Mg/Sr PARA
REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

ELOUISE GAULKE

JOINVILLE

2022

ELOUISE GAULKE

BIOCOMPÓSITO HÍBRIDO A BASE DE CELULOSE BACTERIANA COM
HIDROXIAPATITA PARCIALMENTE SUBSTITUÍDA POR Mg/Zn E Mg/Sr PARA
REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

Dissertação de Mestrado apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos na Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE.

Orientadora: Prof Dra Ana Paula Testa Pezzin
Coorientadora: Prof Dra Andrea Lima dos Santos Schneider

JOINVILLE

2022

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

G269b Gaulke, Elouise
 Biocompósito híbrido a base de celulose bacteriana com hidroxiapatita
 parcialmente substituída por Mg/Zn e Mg/Sr para regeneração óssea guiada /
 Elouise Gaulke; orientadora Dra. Ana Paula Testa Pezzin, coorientadora Dra.
 Andrea Lima dos Santos Schneider. – Joinville: UNIVILLE, 2022.

 63 f.: il.

 Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos – Universidade da Região de
Joinville)

 1. Ossos – Regeneração. 2. Hidroxiapatita. 3. Materiais biocompatíveis. I.
 Pezzin, Ana Paula Testa (orient.). II. Schneider, Andrea Lima dos Santos. III.
 Título.

CDD 616.71

Termo de Aprovação

“Biocompósito Híbrido a Base de Celulose Bacteriana com Hidroxiapatita Parcialmente Substituída por Mg/Zn e Mg/Sr para Regeneração Óssea Guiada”

por

Elouise Gaulke

Banca Examinadora:

Profª. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Orientadora (UNIVILLE)

Profª. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Coorientadora (UNIVILLE)

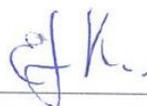
Profª. Dra. Marcia Adriana Tomaz Duarte
(DMB Eletrotech)

Profª. Dra. Marcia Luciane Lange Silveira
(UNIVILLE)

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Engenharia de Processos, área de concentração Desenvolvimento e Gestão de Processos e Produtos e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos.



Profª. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Orientadora (UNIVILLE)



Profª. Dra. Elisabeth Wisbeck
Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos

Joinville, 19 de dezembro de 2022.

Este trabalho é dedicado a Deus,
Senhor da minha vida. Ao meu
esposo Gabriel Siqueira e meus pais
Celso e Eliete Gaulke.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus, que sempre me deu forças para enfrentar os desafios da vida acadêmica.

Aos meus pais Celso e Eliete, que me deram a vida, muito obrigada pelo constante apoio e incentivo no decorrer de todo este processo, vocês são a minha base e o meu porto seguro.

Meu amado esposo, Gabriel Siqueira, obrigada pela sua compreensão, companheirismo, pela sua ajuda nas práticas de laboratório e por todo o seu amor.

Às minhas orientadoras Ana Pezzin e Andrea Schneider obrigada por todos os esclarecimentos e orientações.

Agradeço à professora Michele Garcia por toda a orientação e estímulo desde a graduação.

Agradeço às técnicas dos laboratórios da Univille e aos colegas do grupo de pesquisa de Materiais Poliméricos – Celulose Bacteriana, que sempre se dispuseram a sanar minhas dúvidas.

Registro aqui o meu agradecimento aos técnicos e aos laboratórios de análise da Univille e UFSCar que realizaram todos os ensaios deste projeto.

Agradeço especialmente a CAPES pelo financiamento deste projeto.

Aos demais amigos e familiares, obrigada pelo auxílio e orações, todos vocês são essenciais para mim.

Agradeço.

“Quem presta atenção no que lhe ensinam terá sucesso; quem confia no Senhor será feliz.”

(Provérbios 16:20)

RESUMO

Biocompósito híbrido a base de celulose bacteriana com hidroxiapatita parcialmente substituída por Mg/Zn e Mg/Sr para regeneração óssea guiada

Biocompósitos que buscam promover a reconstrução óssea de forma eficaz e menos dolorosa ao paciente, buscando estimular a osteogênese e a regeneração da área lesionada, têm atraído muitos estudos na área de engenharia tecidual. Neste âmbito, a regeneração óssea guiada (ROG) surge como alternativa para tratamentos de defeitos ósseos, visando a melhora na qualidade de vida dos pacientes. As membranas de celulose bacteriana (CB) possuem uma nanoestrutura porosa interligada tridimensionalmente que traz boas propriedades mecânicas, biocompatibilidade e alta capacidade de retenção de água. Estas características fazem da CB uma ótima opção de *scaffold* para ser utilizado da ROG. Para potencializar o uso da CB, estas podem ser dopadas com hidroxiapatitas (HAp) e outros íons metálicos, produzindo biocompósitos, os quais fornecerão propriedades de ligações ósseas e poderão atuar como dispositivo de implante ósseo, evitando infecções e rejeições. Baseando-se neste contexto, este trabalho estudou a substituição parcial do Ca da hidroxiapatita por Mg/Zn e Mg/Sr nas membranas de celulose bacteriana, visando a produção de um biocompósito para a aplicação em regeneração óssea guiada. As membranas de CB foram sintetizadas em meio contendo manitol, peptona, extrato de levedura, fosfato dissódico anidro e ácido cítrico; e o micro-organismo utilizado foi a bactéria do gênero *Komagataeibacter hansenii*. Para a produção de um biocompósito híbrido, foi feita a incorporação das hidroxiapatitas parcialmente substituídas por Mg/Zn ou Mg/Sr, a qual ocorreu por meio de um ciclo de imersões. A primeira solução de imersão continha soluções de diferentes proporções de CaCl_2 , MgCl_2 e ZnCl_2 ; ou CaCl_2 , MgCl_2 e SrCl_2 . A segunda solução de imersão era de fosfato de sódio dibásico. Os biocompósitos foram caracterizados por análises de porosidade, FTIR, TGA, MEV/EDS e DRX; também foi realizado o ensaio de propriedades antimicrobianas e o ensaio de bioatividade. Os biocompósitos produzidos apresentaram um bom percentual de porosidade. O ensaio de FTIR demonstrou que grupos fosfatos foram incorporados à CB; também foi observada a presença da apatita carbonatada, a qual torna o biomaterial mais próximo à apatita do tecido ósseo. A análise de TGA indicou a presença da fase inorgânica na CB, sugerindo a formação de apatitas metálicas; além disso, os biocompósitos produzidos apresentaram uma estabilidade térmica mais elevada quando comparados à CB pura. Os resultados obtidos pela análise de DRX confirmaram a presença de cristais de HAp, além de picos indicando a incorporação dos elementos Mg, Zn e Sr. As análises de MEV confirmaram a mineralização da matriz de CB com cristais de HAp. Nas concentrações estudadas, os biocompósitos não apresentaram atividade antimicrobiana, no entanto, a análise de EDS confirmou a incorporação dos elementos Mg, Zn e Sr nos biocompósitos, e estes, por sua vez, podem proporcionar benefícios ao *scaffold*, promovendo a regeneração óssea.

Palavras-chave: Regeneração óssea; Celulose bacteriana; Hidroxiapatita; Biocompósitos.

ABSTRACT

Hybrid biocomposite based on bacterial cellulose with hydroxyapatite partially substituted by Mg/Zn and Mg/Sr for guided bone regeneration

Biocomposites that seek to promote bone reconstruction in an effective and less painful way for the patient, seeking to stimulate osteogenesis and regeneration of the injured area, have attracted many studies in the area of tissue engineering. In this context, guided bone regeneration (GBR) appears as an alternative for the treatment of bone defects, aiming at improving the quality of life of patients. Bacterial cellulose (BC) membranes have a three-dimensionally interconnected porous nanostructure that brings good mechanical properties, biocompatibility and high water retention capacity. These features make the CB a great scaffold option for use with ROG. To enhance the use of BC, these can be doped with hydroxyapatites (HAp) and other metal ions, producing biocomposites, which will provide bone bonding properties and may act as a bone implant device, preventing infections and rejections. Based on this context, this work studied the partial replacement of Ca from hydroxyapatite by Mg/Zn and Mg/Sr in bacterial cellulose membranes, aiming at the production of a biocomposite for application in guided bone regeneration. BC membranes were synthesized in medium containing mannitol, peptone, yeast extract, anhydrous disodium phosphate and citric acid; and the microorganism used was the bacteria of the genus *Komagataeibacter hansenii*. For the production of a hybrid biocomposite, the incorporation of hydroxyapatites partially substituted by Mg/Zn or Mg/Sr was carried out, which occurred through a cycle of immersion. The first dip solution contained solutions of different proportions of CaCl_2 , MgCl_2 and ZnCl_2 ; or CaCl_2 , MgCl_2 and SrCl_2 . The second dipping solution was dibasic sodium phosphate. The biocomposites were characterized by porosity, FTIR, TGA, SEM/EDS and XRD analyses; the antimicrobial properties test and the bioactivity test were also carried out. The produced biocomposites showed a good percentage of porosity. The FTIR assay demonstrated that phosphate groups were incorporated into the BC; the presence of carbonated apatite was also observed, which makes the biomaterial closer to the apatite of bone tissue. The TGA analysis indicated the presence of the inorganic phase in the BC, suggesting the formation of metallic apatites; in addition, the produced biocomposites presented a higher thermal stability when compared to pure BC. The results obtained by XRD analysis confirmed the presence of HAp crystals, in addition to peaks indicating the incorporation of the elements Mg, Zn and Sr. SEM analyzes confirmed mineralization of the CB matrix with HAp crystals. At the studied concentrations, the biocomposites did not show antimicrobial activity, however, the EDS analysis confirmed the incorporation of the elements Mg, Zn and Sr in the biocomposites, and these, in turn, can provide benefits to the scaffold, promoting bone regeneration.

Keywords: *Bone regeneration; Bacterial cellulose; Hydroxyapatite; Biocomposites*

RESUMEN

Biocompuesto híbrido a base de celulosa bacteriana con hidroxiapatita parcialmente reemplazada por Mg/Zn y Mg/Sr para regeneración ósea guiada

Los biocompuestos que buscan promover la reconstrucción ósea de manera efectiva y menos dolorosa para el paciente, buscando estimular la osteogénesis y la regeneración del área lesionada, han atraído muchos estudios en el área de la ingeniería de tejidos. En este contexto, la regeneración ósea guiada (GBR) aparece como una alternativa para el tratamiento de los defectos óseos, con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los pacientes. Las membranas de celulosa bacteriana (BC) tienen una nanoestructura porosa interconectada tridimensionalmente que aporta buenas propiedades mecánicas, biocompatibilidad y alta capacidad de retención de agua. Estas características hacen que el CB sea una excelente opción de andamio para usar con ROG. Para potenciar el uso de BC, estos pueden doparse con hidroxiapatitas (HAp) y otros iones metálicos, produciendo biocompuestos, que proporcionarán propiedades de unión al hueso y pueden actuar como un dispositivo de implante óseo, previniendo infecciones y rechazos. Basado en este contexto, este trabajo estudió la sustitución parcial de Ca de la hidroxiapatita por Mg/Zn y Mg/Sr en membranas de celulosa bacteriana, con el objetivo de producir un biocompuesto para su aplicación en la regeneración ósea guiada. Las membranas de BC se sintetizaron en un medio que contenía manitol, peptona, extracto de levadura, fosfato disódico anhidro y ácido cítrico; y el microorganismo utilizado fue la bacteria del género *Komagataeibacter hansenii*. Para la producción de un biocompuesto híbrido, se realizó la incorporación de hidroxiapatitas parcialmente sustituidas por Mg/Zn o Mg/Sr, lo que ocurrió a través de un ciclo de inmersión. La primera solución de inmersión contenía soluciones de diferentes proporciones de CaCl_2 , MgCl_2 y ZnCl_2 ; o CaCl_2 , MgCl_2 y SrCl_2 . La segunda solución de inmersión fue fosfato sódico dibásico. Los biocompuestos se caracterizaron mediante análisis de porosidad, FTIR, TGA, SEM/EDS y XRD; También se realizó la prueba de propiedades antimicrobianas y la prueba de bioactividad. Los biocompuestos producidos mostraron un buen porcentaje de porosidad. El ensayo FTIR demostró que los grupos fosfato se incorporaron al BC; también se observó la presencia de apatita carbonatada, lo que acerca al biomaterial a la apatita del tejido óseo. El análisis de TGA indicó la presencia de la fase inorgánica en el BC, sugiriendo la formación de apatitas metálicas; además, los biocompuestos producidos presentaron una mayor estabilidad térmica en comparación con el BC puro. Los resultados obtenidos por análisis XRD confirmaron la presencia de cristales de HAp, además de picos que indicaban la incorporación de los elementos Mg, Zn y Sr. Los análisis SEM confirmaron la mineralización de la matriz CB con cristales HAp. A las concentraciones estudiadas, los biocompuestos no mostraron actividad antimicrobiana, sin embargo, el análisis EDS confirmó la incorporación de los elementos Mg, Zn y Sr en los biocompuestos, y estos, a su vez, pueden brindar beneficios al andamio, promoviendo la regeneración ósea.

Palabras llave: *Regeneración ósea; celulosa bacteriana; hidroxiapatita; Biocompuestos.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da celulose	23
Figura 2 - Esquema dos mecanismos de formação dos cristais de Hidroxiapatitas nas nanofibras de Celulose Bacteriana.....	25
Figura 3 - Fluxograma demonstrativo do processo de síntese da CB e preparo dos biocompósitos	30
Figura 4 - Membranas de CB: A) síntese; B) purificação; C) liofilização	34
Figura 5 - Biocompósitos produzidos em soluções híbridas de imersão com concentrações diferentes	35
Figura 6 – Valores médios de porosidade média dos biocompósitos: A) CB/HAp Mg-Zn; e B) CB/HAp Mg-Sr.....	36
Figura 7 - Análise de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR/ATR) dos biocompósitos: A) CB/HAp Mg/Zn; e B) CB/HAp Mg/Sr.....	38
Figura 8 - Curva TG e DTG dos biocompósitos: a) CB/HAp Mg-Zn; b) CB/HAp Mg-Sr	41
Figura 9 - Difrátogramas de raios - X dos biocompósitos CB/HAp: a) Parcialmente substituídos por Mg/Zn e b) Parcialmente substituídos por Mg/Sr	44
Figura 10 - Micrografias de superfície da A) CB/HAp - Controle; B) EDS do biocompósito controle e C) CB pura.....	46
Figura 11 - Micrografias de superfície e análises de EDS dos biocompósitos incorporados com HAp parcialmente substituída por Mg-Zn.....	47
Figura 12 - Micrografias de superfície e análises de EDS dos biocompósitos incorporados com HAp parcialmente substituída por Mg-Sr	48
Figura 13 - Ensaio de ação antimicrobiana dos biocompósitos produzidos	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração e Nomenclatura das amostras	30
Tabela 2 - Bandas observadas na análise de FTIR/ATR para os biocompósitos	39
Tabela 3 - Dados referentes à temperatura máxima de degradação (T _{máx}) e porcentagem de perda de massa (M %) obtidos das curvas TG e DTG dos biocompósitos produzidos	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1	TECIDO ÓSSEO	19
3.2	DEFEITOS ÓSSEOS E REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA	20
3.3	BIOMATERIAIS EM ENGENHARIA TECIDUAL	21
3.4	CELULOSE BACTERIANA	22
3.5	HIDROXIAPATITAS	24
4	METODOLOGIA.....	28
4.1	SÍNTESE DOS BIOCAMPÓSITOS.....	28
4.1.1	Micro-organismo.....	28
4.1.2	Meios de cultivo.....	28
4.1.3	Condições de cultivo.....	28
4.1.4	Purificação das membranas	29
4.2	FUNCIONALIZAÇÃO DA CB	29
4.3	ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO	31
4.3.1	Determinação da Porosidade	31
4.3.2	Análise Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (FTIR/ATR).....	32
4.3.3	Análise termogravimétrica (TGA).....	32
4.3.4	Difratometria de raios -X (DRX)	32
4.3.5	Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV) com Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS).....	32
4.4	ENSAIO DE PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34

5.1	SÍNTESE DA MEMBRANA DE CB	34
5.2	PRODUÇÃO DOS BIOCOMPÓSITOS	34
5.3	ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO	36
5.3.1	Determinação da porosidade.....	36
5.3.2	Análise Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (FTIR/ATR).....	37
5.3.3	Análise termogravimétrica (TGA).....	41
5.3.4	Difratometria de raios-X (DRX)	43
5.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV) com Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS).....	45
5.4	ENSAIO DE PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS	49
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
7	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Cerca de 20 milhões de cirurgias ortopédicas são realizadas por ano, em todo o mundo, com a finalidade de tratar doenças degenerativas e congênitas, infecções, tumores e também traumas derivados de acidentes de trânsito. Deste total de cirurgias realizadas, 70% necessitam utilizar algum tipo de enxerto para preencher ou reparar o defeito ósseo (MAIA et al., 2021; QIU; CUI; WANG, 2019). No entanto, o uso de certos materiais para enxertos pode apresentar rejeição tecidual ou ainda um baixo desempenho osteogênico (MAIA et al., 2021). Para auxiliar no processo de reconstrução tecidual e minimizar a rejeição, a engenharia de tecidos visa desenvolver um material e um procedimento que promova a reconstrução óssea de forma mais eficaz e menos dolorosa ao paciente, promovendo a recuperação da área lesionada e melhorando a qualidade de vida das pessoas (PINA et al., 2017).

Nesse âmbito, a regeneração óssea guiada (ROG) surgiu como alternativa da engenharia de tecidos para possibilitar o tratamento dos defeitos ósseos e induzir o reparo tecidual (LUZ et al., 2020; ZOU et al., 2019). A ROG é uma técnica amplamente conhecida por orientar a regeneração do osso, já que esta é baseada no uso de *scaffolds*, que são barreiras implantadas cirurgicamente, as quais serão responsáveis pela formação de um espaço isolado que irá impossibilitar os tecidos não osteogênicos de interferir na regeneração óssea. Os *scaffolds* utilizados na ROG precisam ser bons substitutos biológicos, assemelhando-se com a matriz extracelular do tecido ósseo. Assim, é fundamental que estes arcabouços apresentem características como biocompatibilidade, ser biorreabsorvível, alta porosidade, resistência mecânica, uma boa interação molecular, além de possuir uma taxa de degradação adequada, para conseguir manter a resistência mecânica do tecido recém formado (ELGALI et al., 2017; FAJSTAVROVÁ et al., 2021; LUZ et al., 2020; PINA et al., 2017a; ZOU et al., 2019).

Levando em consideração todos estes parâmetros, as membranas de celulose bacteriana (CB) podem ser uma excelente opção de *scaffolds*, já que estas são consideradas como um biomaterial natural, biocompatível e que atende grande parte das características necessárias para serem aplicadas na ROG (AN et al., 2017).

A CB é um polissacarídeo secretado por bactérias do gênero *Komagataeibacter*, que possui nanofibras dispostas tridimensionalmente em sua estrutura molecular, tal fato influencia diretamente na bioatividade da CB, já que esta

contém uma área superficial maior para proporcionar as ligações celulares (MAIA et al., 2021; WAN et al., 2011). Uma das principais vantagens da CB é o fato de que sua superfície permite a adsorção de íons metálicos, nanopartículas, enzimas, entre outros componentes, que visam aprimorar ainda mais seus benefícios (ARAÚJO et al., 2018; PINA et al., 2017a). Desta forma, para potencializar o uso da CB, estas podem ser funcionalizadas com outras substâncias para formar biocompósitos, como por exemplo, a incorporação de fontes de fosfato de cálcio. Assim, o material produzido fornecerá propriedades de ligações ósseas e poderá atuar como dispositivo de implante ósseo (MAIA et al., 2021; PINA et al., 2017a).

As fontes de fosfato de cálcio, em especial as hidroxiapatitas (HAp), são amplamente estudadas pela engenharia tecidual, pois apresentam uma composição química semelhante aos sais inorgânicos presentes no tecido ósseo. Assim, um biomaterial contendo HAp apresentaria boa biocompatibilidade e auxiliaria na integração osteogênica do *scaffold* (Al et al., 2020; BAZIN et al., 2021). Outros autores avaliaram a substituição parcial do cálcio (Ca) da HAp, por outros íons metálicos que podem ser encontrados no organismo do homem. Esta substituição é realizada com a finalidade de aprimorar as propriedades físico-químicas do material e conseqüentemente, melhorar a resposta biológica do implante ósseo (SANTOS et al., 2021). Estes oligoelementos (como magnésio, zinco, estrôncio, prata, cobre) associados às apatitas do biomaterial têm potencial de promover benefícios para a osteogênese, bem como fornecer propriedades antimicrobianas ao material produzido (BAUER; IVANKOVIĆ; IVANKOVIĆ, 2018; DIAS, 2020; MAIA et al., 2021; TAO et al., 2016).

O magnésio (Mg) possui propriedades mecânicas muito próximas ao tecido ósseo, sendo considerado biocompatível e vital para o organismo humano. Além disso, o Mg desempenha um papel importante no crescimento ósseo, pois estimula a propagação dos osteoblastos e traz características antibacterianas, antitumorais e anti-inflamatórias ao biomaterial (MONTEIRO; VANNUCCHI, 2010; PADMANABHAN et al., 2021; SABET; JABBARI; SEDIGHI, 2018; XU et al., 2019). Além disso, a ausência de Mg nos ossos, pode deter o seu crescimento e provocar a sua fragilidade (TAO et al., 2016).

O estrôncio (Sr) pode estimular a formação óssea por meio da proliferação dos osteoblastos e inibição das células osteoclásticas, reduzindo a reabsorção óssea (HASSAN et al., 2022; LUZ et al., 2020; MANOOCHEHRI et al., 2022; TAO et al.,

2016). A combinação do Sr com biomateriais pode favorecer o tratamento da osteoporose, já que pode resultar no aumento da bioatividade e biocompatibilidade (LUZ, 2016).

O zinco (Zn) também é um oligoelemento considerado fundamental para o metabolismo ósseo, que pode promover a apoptose das células osteoclásticas, inibindo a reabsorção óssea. De outro modo, o Zn também estimula a propagação dos osteoblastos e conseqüentemente, a mineralização da matriz óssea (DIAS, 2020; TAO et al., 2016). Biomateriais funcionalizados com Zn também podem apresentar um comportamento antibacteriano, antifúngico e anti-infeccioso (DIAS, 2020; OFUDJE et al., 2019; WEI et al., 2020).

Conforme Garcia (2022), um biomaterial a base de celulose bacteriana e hidroxiapatita parcialmente substituída pelos íons metálicos Mg^{+2} , Zn^{+2} ou Sr^{+2} pode-se mostrar eficaz quando utilizados em implantes ósseos. No entanto, este estudo verificou o comportamento dos íons de forma isolada.

Assim, baseando-se neste contexto, este trabalho estudou a substituição parcial da hidroxiapatita pelo híbrido composto por Mg/Zn e Mg/Sr nas membranas de celulose bacteriana, visando a produção de um biocompósito para a aplicação em regeneração óssea guiada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver biocompósitos a partir de membranas de celulose bacteriana com hidroxiapatita parcialmente substituída por Mg/Zn e Mg/Sr em diferentes composições, para regeneração óssea guiada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir membranas de celulose bacteriana contendo diferentes teores de hidroxiapatitas parcialmente substituída por Mg/Zn e Mg/Sr.
- Realizar a caracterização físico-química dos bicompositos produzidos por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), análise termogravimétrica (TGA), difração de raios -X (DRX).
- Avaliar a morfologia dos biocompositos.
- Determinar o efeito antibacteriano dos biocompositos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 TECIDO ÓSSEO

Os tecidos conjuntivos são responsáveis pelo fornecimento de estruturas de suporte e ligação, sendo formados por células e pela matriz extracelular (ME). Já as células que constituem o tecido conjuntivo possuem funções de armazenamento de metabólitos, além de fornecerem respostas imunológicas e inflamatórias, e auxiliarem no reparo do tecido após alguma lesão. O tecido ósseo compreende uma subclassificação dos tecidos conjuntivos especiais, os quais apresentam propriedades especiais em relação aos demais tecidos (KIERSZENBAUM, 2008).

Desta forma, Kierszenbaum (2008) afirma que o tecido ósseo é constituído por um tecido conjuntivo mais denso, que possuem células e ME especializadas. Isto também ocorre com a cartilagem, porém esta contém uma ME não-calcificada, enquanto que o tecido ósseo é constituído por uma ME calcificada. Ambos os tecidos conjuntivos especiais desempenham funções mecânicas e de sustentação.

Em concordância com Souza (2015), o qual afirma que a constituição do tecido ósseo é baseada em uma parte mineral (65%), outra parte orgânica (20%) e água (15%), sendo que este tecido possui funções de locomoção, suporte, proteção, assim como a reserva de minerais. Desta forma, o tecido ósseo remodela-se constantemente, por meio da reabsorção e deposição de matriz óssea.

No tecido ósseo há alguns tipos distintos de células os quais se diferem a partir de sua linhagem. A linhagem osteoblástica, a qual inclui as células osteoprogenitoras, que contém propriedades das células-tronco, potencial para proliferação e capacidade de diferenciação; os osteócitos, células altamente ramificadas situadas em lacunas no interior da matriz; e os osteoblastos, células responsáveis pela produção do tecido ósseo, a qual contém proteínas que interagem-se formando um arcabouço que auxilia no depósito de sais minerais promovendo a mineralização. E a linhagem osteoclástica, formada pelos osteoclastos, células grandes móveis e multinucleadas que possuem como função a remodelação e renovação do tecido ósseo (KIERSZENBAUM, 2008; NANCI, 2013).

3.2 DEFEITOS ÓSSEOS E REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

Defeitos ósseos são deformidades que afetam o tecido ósseo, os quais tem origem em algum tipo de doença, como a osteoporose, a osteomolite e a osteogênese imperfeita. Porém os defeitos ósseos também podem se apresentar a partir de traumas causados por acidentes de trânsito, acidentes de trabalho, entre outras fatalidades. A forma mais comumente utilizada para tratar tais defeitos são as cirurgias ósseas, sendo que esta técnica normalmente utiliza enxertos para reconstruir as áreas lesionadas (PINA et al., 2017).

Cerca de 20 milhões de cirurgias ósseas são realizadas a cada ano e deste total, boa parte dos procedimentos necessitam utilizar algum enxerto para reparar a região lesionada. Conhecendo-se estes dados, há uma preocupação principalmente em relação aos problemas causados pelo autoenxerto e aloenxerto, técnicas que podem apresentar limitações, rejeições e complicações (CARVALHO et al., 2016; MAIA et al., 2021).

Para realizar o procedimento baseado em enxerto, é necessário retirar o tecido de uma segunda parte doadora, que pode ser da própria pessoa, no caso de autoenxerto, ou de pessoas secundárias (aloenxertos), sendo que no segundo caso, os relatos de rejeição são ainda mais significativos. Conseqüentemente, a engenharia tecidual busca um procedimento que realize a reconstrução necessária utilizando uma técnica menos invasiva (LEBARBENCHON, 2017).

Portanto, a regeneração óssea guiada (ROG) surgiu como uma alternativa cabível para se tratar tais defeitos ósseos e induzir o reparo tecidual. Esta técnica visa formar um espaço isolado, com o uso de *scaffolds*, os quais são barreiras implantadas cirurgicamente que tem como objetivo orientar a regeneração óssea. A expressão *scaffold* descreve todas as estruturas porosas que podem ser utilizadas em implantes, fornecendo suporte aos mecanismos de reparo ósseo (GIANNOULATOU et al., 2018). Estes *scaffolds* tem por função criar um espaço isolado para não permitir a passagem de tecidos fibrosos de crescimento rápido, nem de outros tecidos moles para a área lesionada. Conseqüentemente, as células osteogênicas terão um tempo maior para poder migrar para o defeito ósseo e habitá-lo, promovendo uma melhor recuperação (GARCIA, 2022; LUZ et al., 2020; MAIA et al., 2021; TU et al., 2017; ZOU et al., 2019).

Os primeiros relatos do uso de barreiras para regeneração tecidual foram feitos há 50 anos, e tratam da utilização de filtros de acetato de celulose que foram

implantados para regenerar nervos e tendões. Posteriormente, foi introduzido o fundamento de Regeneração Tecidual Guiada, a qual buscava recuperar um tecido específico que foi perdido com o uso de células capazes de preencher o local durante a cicatrização (GARCIA, 2022; RETZEPI; DONOS, 2010).

3.3 BIOMATERIAIS EM ENGENHARIA TECIDUAL

As membranas utilizadas na engenharia tecidual devem ter alguns requisitos, como características de oclusão celular e estabilização de feridas, as quais podem criar um espaço estável para a regeneração da parte lesionada (RISPOLI et al., 2015).

Além disso, a engenharia de tecido ósseo possui uma abordagem que visa recuperar as funções do tecido ósseo danificado ou doente. O osso é um tecido considerado complexo, o qual possui características celulares, porosidade e vascularização distinta, além de conter um importante papel mecânico para o corpo humano (SCHROEDER, 2018).

Na engenharia tecidual, há uma classificação dos biomateriais, a classe dos polímeros naturais e a classe dos polímeros sintéticos. Dentre os polímeros naturais se encontram a celulose bacteriana, o colágeno e a quitosana. Estes polímeros possuem uma ótima biocompatibilidade, ou seja, possuem a capacidade de agir quando colocado em contato com a lesão, sem causar rejeição imunológica, originando produtos sem toxicidade. Já os polímeros sintéticos apresentam a vantagem de serem reproduzidos e manipulados para uma melhor adaptação conforme a finalidade do seu uso (RODRIGUES, 2012).

Para serem considerados bons substitutos biológicos e assim serem utilizados na ROG, os *scaffolds* precisam ser semelhantes à matriz extracelular do tecido ósseo. Assim, os polímeros ideais necessitam apresentar uma rigidez mecânica, além de uma estrutura tridimensional que possibilita a máxima interação superficial e adesão celular. Desta forma, os polímeros naturais se apresentam como uma boa alternativa para interagir com o organismo humano, pois possuem uma semelhança com os componentes da matriz extracelular, diminuindo as reações imunológicas e a toxicidade, que são comuns em polímeros sintéticos (ANTÔNIO et al., 2012; ELGALI et al., 2017; RODRIGUES, 2012).

Além disso, é primordial que os *scaffolds* tenham características como uma boa biocompatibilidade, ser biorreabsorvível, uma boa interação molecular, e também ter

uma taxa de degradação adequada, para manter a resistência mecânica do tecido recém formado por tempo suficiente até a recuperação da lesão. Outra característica fundamental é a porosidade do *scaffolds*, a qual é recomendada que seja equivalente ou superior a 90% para materiais substitutos ósseos, possibilitando a acomodação das células osteoprogenitoras. Outro fator importante é que o biomaterial seja osteocondutivo, ou seja, que ele tenha a capacidade de estimular e sustentar a formação de um novo tecido ósseo em sua superfície; e esta característica está relacionada com a bioatividade do material, a qual pode ser promovida por meio da adesão de uma fina camada de HAp carbonatada no *scaffold* (ELGALI et al., 2017; FAJSTAVROVÁ et al., 2021; GARCIA, 2022a; LUZ, 2016; PINA et al., 2017b; RAHMAN et al., 2019; ZOU et al., 2019).

Assim, considerando todos estes parâmetros, a celulose bacteriana é opção natural para ser utilizada na engenharia tecidual, podendo esta ser uma excelente alternativa de *scaffold*, já que esta atende grande parte das características indispensáveis para a aplicação da ROG (AN et al., 2017; ANTÔNIO et al., 2012; RODRIGUES, 2012).

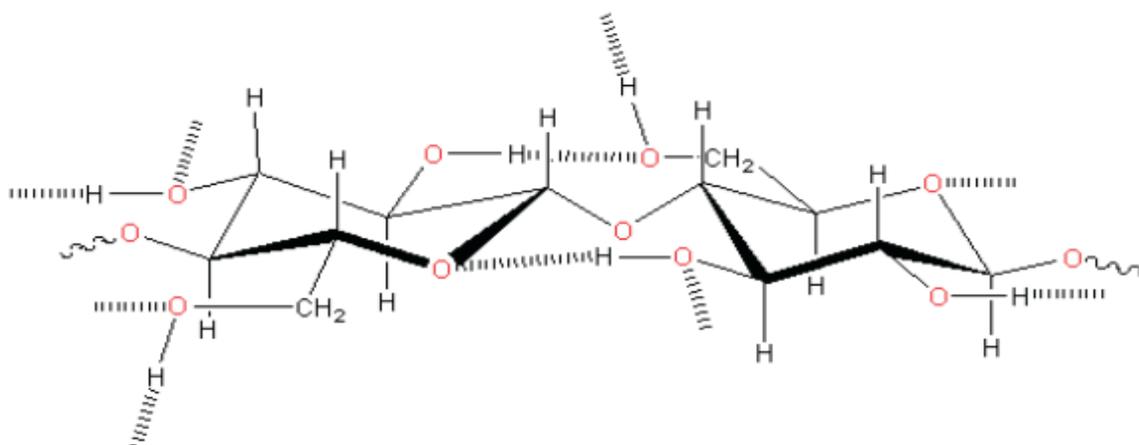
3.4 CELULOSE BACTERIANA

A celulose pertence à classe dos polímeros naturais e é baseada em uma composição ligações glicosídicas do tipo β (1→4), ligadas em cadeia linear. Além de ser encontrada na parede celular das plantas, a celulose também pode ter origem em fungos, algas, e bactérias (RECOUVREUX, 2008).

A celulose oriunda de bactérias contém a estrutura química semelhante à celulose das plantas, porém a sua morfologia é distinta. O processo de obtenção e purificação da celulose bacteriana é simples, enquanto que a celulose obtida das plantas necessita de um método mais complexo de purificação, o qual demanda mais investimento financeiro e produz poluentes no processo de extração da lignina e hemicelulose (BROWN; SAXENA; KUDLICKA, 1996; RECOUVREUX, 2008).

A Figura 1 indica a estrutura química da CB, onde as linhas pontilhadas indicam as possíveis ligações de hidrogênio.

Figura 1 - Estrutura química da celulose



Fonte: DONINI et al., 2010.

Para a produção das membranas de CB pode-se utilizar bactérias do gênero *Gluconacetobacter hansenii*, as quais foram renomeadas e atualmente são denominadas como *Komagataeibacter hansenii*, e são facilmente encontradas em frutas e vegetais e não patogênicas. As bactérias deste gênero proporcionam a produção de nanofibras de celulose pura (ANTÔNIO et al., 2012; DU et al., 2016; YAMADA et al., 2012).

Desta forma, a CB secretada por bactérias possui em sua estrutura molecular nanofibras dispostas tridimensionalmente, interligadas por ligações de hidrogênio. Tal formato influencia diretamente nas propriedades da CB, como a cristalinidade, biocompatibilidade, nível de retenção de água e também na sua bioatividade, já que contém uma área superficial maior para proporcionar as ligações celulares (MAIA et al., 2021; WAN et al., 2011). Estas condições trazem uma maior qualidade para as técnicas de regeneração, principalmente em órgãos do corpo, como a pele, cartilagem, nervos, coração, vasos sanguíneos e nos ossos (AN et al., 2017; FISCHER et al., 2017; PIGOSSI, 2014; RECOUVREUX, 2008).

A utilização das membranas de CB como curativo oclusivo fornece um substrato tridimensional ideal para a fixação celular, além de proporcionar uma barreira física que reduz a dor, infecção e permite a transferência de medicamentos para a região lesionada. Deste modo, o uso da CB em dispositivos médicos é uma alternativa para auxiliar na cicatrização de lesões cutâneas ou em engenharia tecidual, já que este material promove a regeneração celular (PICHETH et al., 2017)

Além disso, a utilização de polímeros naturais como matriz, apresentando reforços de partículas inorgânicas, podem proporcionar ao biomaterial uma melhor ação antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, diminuindo os riscos de infecções e proporcionando uma melhor recuperação tecidual. E a CB, por sua vez, possibilita a adição de outras substâncias visando a produção de biocompósitos, como por exemplo, a inserção de fontes de fosfato de cálcio. Desta forma, o produto final apresentará características de ligações ósseas, podendo atuar como dispositivo de implante ósseo (DONINI et al., 2010; LANGROUDI; SARAVANI; NOURI, 2017; MAIA et al., 2021; PINA et al., 2017).

Para avançar nas pesquisas sobre engenharia tecidual, esta associa tecnologias e novos materiais para reproduzir o tecido ósseo. Assim, a união de diferentes biomateriais, composições e propriedades estão sendo exploradas, com a finalidade de se desenvolver um biocompósito mais potente para a regeneração óssea. Porém, a carência de processos bioquímicos que gerem a biodegradação da celulose bacteriana no organismo do homem, torna a absorção deste biomaterial mais complexa, sendo este um desafio para ser vencido pela engenharia tecidual (GARCIA, 2022).

3.5 HIDROXIAPATITAS

Fontes de fosfato de cálcio, especialmente as hidroxiapatitas (HAp) são amplamente estudadas pela engenharia de tecidos, pois contém uma composição química que se assemelha aos sais inorgânicos da matriz óssea. A HAp representa até 70% da massa óssea seca, desta forma, um biomaterial contendo HAp apresentaria boa biocompatibilidade e também melhoraria a integração osteogênica do *scaffold* (Al et al., 2020; BAZIN et al., 2021; KIERSZENBAUM, 2008). Fang e colaboradores (2009) concordam, afirmando que a principal matriz óssea inorgânica humana é a HAp, o que traz uma ótima biocompatibilidade ao biocompósito dopado destas fontes.

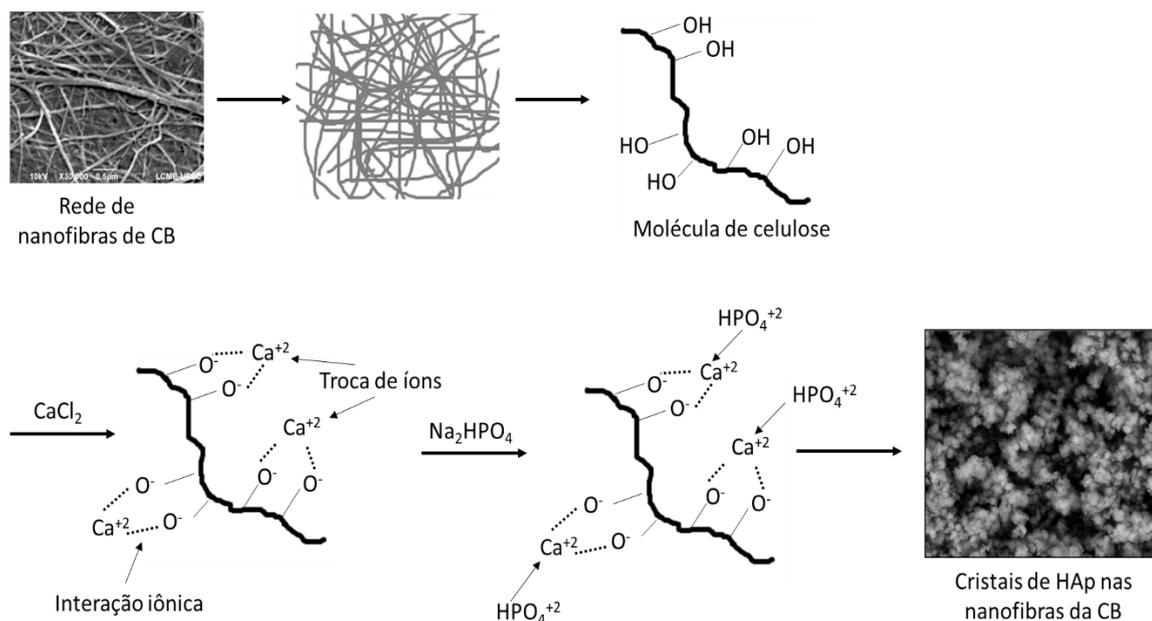
As HAp são consideradas cerâmicas de fosfato de cálcio e a maioria é reabsorvível e pode ser dissolvida quando é exposta em ambientes fisiológicos, sendo assim, são materiais biocerâmicos. A fórmula estequiométrica da HAp é

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, e a razão entre cálcio e o fosfato é equivalente a 1,67 (NATH; BASU; SINHA, 2006; WU et al., 2020).

A síntese das partículas de HAp é realizada com base em diferentes métodos e temperatura, assim, estas rotas de síntese distintas podem ocasionar diferentes produções de HAp. Sendo que estas partículas podem apresentar formas e tamanhos distintos, este fato implica nas características biológicas e propriedades bioativas distintas para cada rota de síntese (EHRET et al., 2017).

A Figura 2 apresenta um esquema dos mecanismos de formação dos cristais de HAp sobre as nanofibras de CB. O processo de produção consiste em imergir as membranas de CB em soluções de CaCl_2 e Na_2HPO_4 , alternadamente. Ao final dos ciclos de imersão, obtém-se um biomaterial a base de CB e HAp (MINATTI, 2020; SASKA et al., 2011).

Figura 2 - Esquema dos mecanismos de formação dos cristais de Hidroxiapatitas nas nanofibras de Celulose Bacteriana



Fonte: Adaptado de MINATTI (2020)

A HAp unida com a celulose bacteriana resulta em um biocompósito na forma de hidrogel nanoestruturado, sendo que este é uma ótima matriz para a incorporação de outros compostos. Esta união pode trazer benefícios na reparação tecidual, além de estes serem considerados osteocondutores (PIGOSSI, 2014).

Além disso, alguns estudos avaliam a substituição parcial do cálcio (Ca) da HAp, por outros íons metálicos os quais também são encontrados no organismo do homem; estes elementos são chamados de oligoelementos ou então elementos traço, os quais são nutrientes existentes nos ossos, porém em baixas quantidades, mas que podem aumentar a osteogênese e a neovascularização (EHRET et al., 2017; GARCIA, 2022).

Há alguns oligoelementos (como magnésio, zinco, estrôncio, prata, cobre) os quais podem desempenhar um papel muito importante no crescimento e na reparação óssea (BAUER; IVANKOVIĆ; IVANKOVIĆ, 2018; DIAS, 2020; MAIA et al., 2021; TAO et al., 2016). Estes oligoelementos são incorporados na HAp, auxiliando no controle da degradação, no aumento da resistência mecânica dos materiais e na regulação das propriedades bioativas (EHRET et al., 2017).

O Mg é um oligoelemento que possui características mecânicas muito próximas ao tecido ósseo. Além disso, o Mg estimula a propagação das células osteoblásticas, e pode trazer propriedades antibacterianas, antitumorais e anti-inflamatórias ao biomaterial (MONTEIRO; VANNUCCHI, 2010; PADMANABHAN et al., 2021; SABET; JABBARI; SEDIGHI, 2018; XU et al., 2019). O Mg também possui uma boa taxa de degradação em ambientes fisiológicos, e o produto deste processo é um componente natural do corpo humano, desta forma há uma redução de risco de rejeição do implante pelo paciente (LIU et al., 2016; XU et al., 2019). O uso do Mg nas apatitas pode trazer favorecer a biocompatibilidade do implante em casos de osteoporose (BAUER; IVANKOVIĆ; IVANKOVIĆ, 2018).

Outro oligoelemento de suma importância é o Zn, o qual desempenha uma função vital no desenvolvimento e crescimento normal dos ossos, já que este pode estimular a apoptose dos osteoclastos, desfavorecendo a reabsorção óssea. O Zn também promove a proliferação dos osteoblastos, estimulando a mineralização da matriz óssea (DIAS, 2020; TAO et al., 2016). A falta de Zn prejudica o desenvolvimento ósseo e este fato pode ser o precursor da osteoporose. Assim, a substituição parcial do Ca por Zn nas HAp visa a estimulação da formação óssea e o aumento da resposta osteogênica, melhorando assim, a capacidade de formação e regeneração dos ossos (YU *et al.*, 2017). Biomateriais contendo Zn também podem demonstrar características antibacterianas, antifúngicas e anti-infecciosas (DIAS, 2020; OFUDJE et al., 2019; WEI et al., 2020).

Já o Sr faz parte deste grupo de oligoelementos e pode trazer benefícios para a regeneração óssea pois este estimula a proliferação dos osteoblastos e reduz a reabsorção óssea (HASSAN et al., 2022). Biomateriais dopados de Sr também podem apresentar bons resultados em tratamentos de osteoporose, já que este elemento favorece o aumento da bioatividade e biocompatibilidade (LUZ, 2016).

4 METODOLOGIA

4.1 SÍNTESE DOS BIOCOMPÓSITOS

O processo de síntese dos biocompósitos a base de membranas de celulose bacteriana com hidroxiapatita parcialmente substituída está demonstrado na Figura 3:

4.1.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a *bactéria Komagataeibacter hansenii*, da linhagem ATCC 23769. Para a manutenção destes micro-organismos, estes foram mantidos sob refrigeração.

4.1.2 Meios de cultivo

O meio de cultivo utilizado na da fase de ativação das células e na fase de produção das membranas foi o mesmo. E este era constituído por manitol (20 g L⁻¹), peptona (5 g L⁻¹), extrato de levedura (5 g L⁻¹), fosfato dissódico anidro (2,7 g L⁻¹) e ácido cítrico anidro (1,37 g L⁻¹), sendo estes autoclavados a 121 °C por 25 min (GARCIA, 2022).

4.1.3 Condições de cultivo

As células foram ativadas em frasco de Erlenmeyer (500 mL) contendo 200 mL de meio e incubadas a 30 °C sob condições estáticas por 2 dias. Após este período, o pré-inóculo foi transferido para o meio de cultivo, a uma taxa de 20% (V/V). Esta etapa foi conduzida em frascos de Erlenmeyer de 125 mL com 40 mL de meio de cultivo e 10 mL de pré-inóculo, a 30 °C e condição estática durante 9 dias para a formação das mantas hidratadas de celulose bacteriana com uma espessura média de 1,27 mm ± 0,01.

4.1.4 Purificação das membranas

Para a purificação da CB formada na superfície líquida da cultura, as membranas foram removidas dos frascos, lavadas com água destilada e tratadas com solução de NaOH 0,1 M a 80 °C por 60 min. Este processo foi realizado para remover as células bacterianas e outras impurezas. Após isso, as membranas foram lavadas com água destilada até atingir pH 7, e seguiram para a autoclave, onde foram esterilizadas a 121 °C por 25 min.

4.2 FUNCIONALIZAÇÃO DA CB

Foram produzidas cinco soluções de imersão: solução de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 0,1 M, solução de cloreto de zinco ($ZnCl_2$) 0,1 M, solução de cloreto de estrôncio ($SrCl_2$) 0,1 M, solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 0,1 M e uma solução de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) 0,06 M, com proporção entre o metal e o fósforo mantida em 1,67 (NATH *et al.*, 2006). O processo de funcionalização foi previamente descrito no fluxograma da Figura 3.

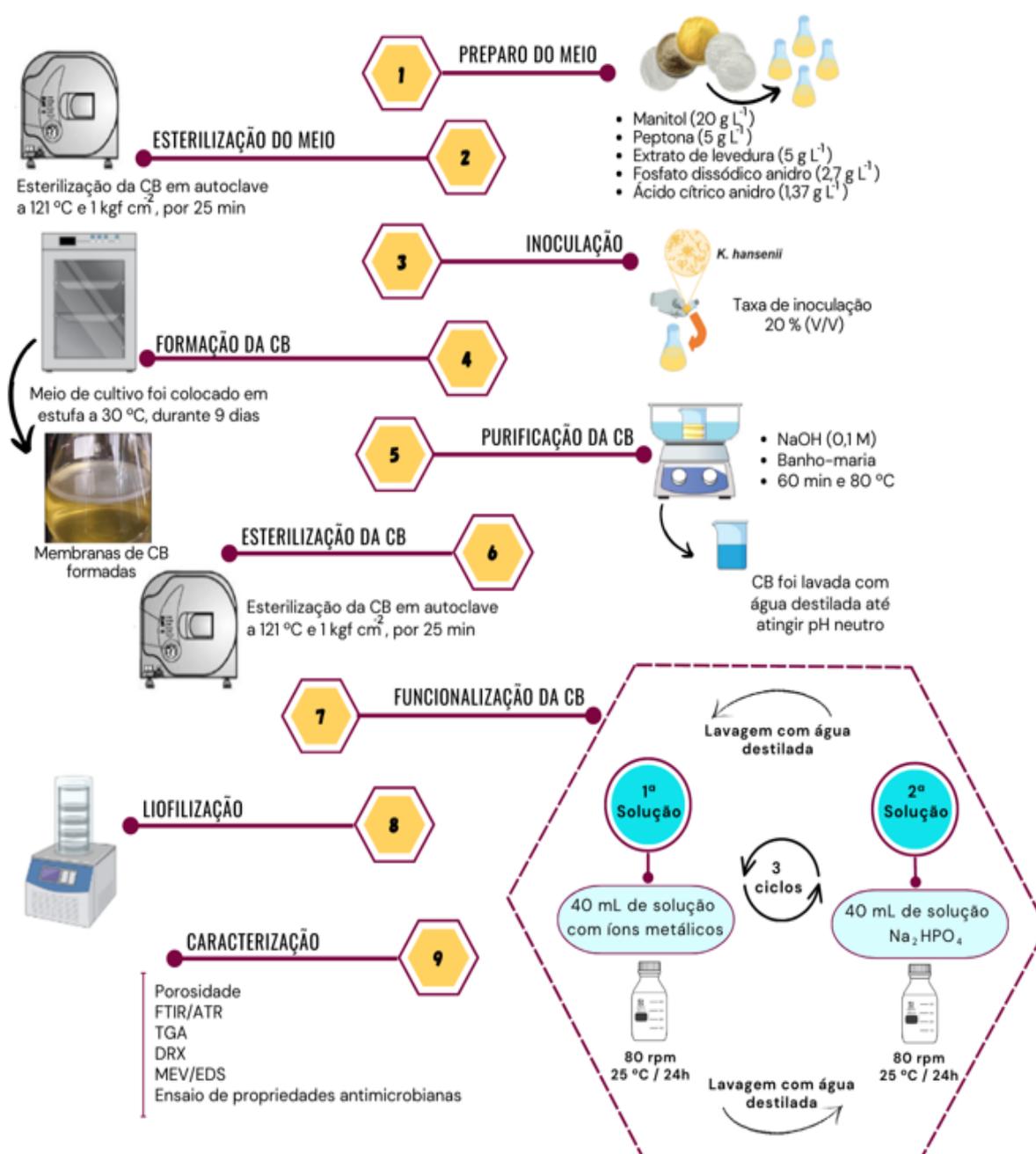
Para a preparação da amostra controle, as membranas de CB foram imersas em um frasco de Duran contendo 40 mL da 1ª solução de imersão ($CaCl_2$ 0,1 M, pH 6,58, 24 h) visando a produção de um material contendo apenas a hidroxiapatita (HAp). Na sequência, as membranas foram lavadas com água destilada, para remoção dos excessos da 1ª solução de imersão. Em seguida, estas foram imersas em 40 mL da 2ª solução de imersão (Na_2HPO_4 0,06 M, pH 8, 24 h) (SASKA *et al.*, 2011).

Com a finalidade de substituir parcialmente o cálcio das HAs por outro íon metálico, foram preparadas amostras híbridas. Onde a 1ª solução de imersão continha: $CaCl_2$, $MgCl_2$ e $ZnCl_2$ (pH 6); ou $CaCl_2$, $MgCl_2$ e $SrCl_2$ (pH 6,2) nas proporções descritas na Tabela 1. As membranas ficaram nestas soluções híbridas por 24 h. Após este período, as mesmas foram lavadas com água destilada e colocadas na 2ª solução de imersão (Na_2HPO_4) compondo assim os biomateriais híbridos.

Tabela 1 - Concentração e Nomenclatura das amostras

Nome da amostra		Concentração HAp % (V/V)			
		Ca ⁺²	Mg ⁺²	Zn ⁺²	Sr ⁺²
C	CB/ HAp - Controle	100	-	-	-
M₁	CB/ 1% Mg – 4% ZnHAp	95	1	4	-
M₂	CB/ 2,5% Mg – 2,5% ZnHAp	95	2,5	2,5	-
M₃	CB/ 4% Mg - 1% ZnHAp	95	4	1	-
M₄	CB/ 1% Mg – 4% SrHAp	95	1	-	4
M₅	CB/ 2,5% Mg – 2,5% SrHAp	95	2,5	-	2,5
M₆	CB/ 4% Mg - 1% SrHAp	95	4	-	1

Figura 3 - Fluxograma demonstrativo do processo de síntese da CB e preparo dos biocompósitos



No decorrer do processo de funcionalização, as membranas foram mantidas nas soluções de imersão, sob a agitação de 80 rpm e temperatura de 25 °C, em *shaker* (Certomat® U, modelo 0345). Foram realizados três ciclos de imersão, com o objetivo de formar e incorporar fontes de fosfato de cálcio nas membranas de celulose e substituir parcialmente as hidroxiapatitas por Mg/Zn e Mg/Sr.

4.3 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO

As membranas de CB e biomateriais formados foram liofilizados e então caracterizados pelas técnicas de porosidade, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com acessório de reflectância total atenuada (FTIR/ATR), microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia por energia dispersiva (MEV/EDS), análise termogravimétrica (TGA) e difração de raios-X (DRX).

4.3.1 Determinação da Porosidade

Com o intuito de calcular o volume total de poros dos biomateriais, as amostras foram pesadas previamente úmidas e após 24 h do processo de liofilização. A porosidade dos biomateriais, foi determinada de acordo com Zeng e Ruckenstein (1996), por meio da Equação 1. Onde, ε é a porosidade da membrana, m_1 e m_2 são as massas (gramas) da membrana úmida e seca, respectivamente, $\rho_{\text{água}}$ é a massa específica da água obtida a 20 °C, que é equivalente à 0,9982 g/cm³, e v é o volume (cm³) da membrana úmida, calculado por meio da Equação 2.

$$\varepsilon (\%) = \frac{(m_1 - m_2) / \rho_{\text{água}}}{v} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

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

Onde, D representa o diâmetro (cm) e h é referente à espessura (cm) da membrana. As análises foram realizadas em triplicada, o diâmetro das amostras era de 17 mm e a espessura média das membranas era de 1,27 mm \pm 0,01.

4.3.2 Análise Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (FTIR/ATR)

As análises de FTIR foram realizadas com o intuito de caracterizar e identificar a presença das bandas características de CB e das fontes de fosfato. O ensaio foi realizado no equipamento da Perkin-Elmer Spectrum (Laboratório de Caracterização de Materiais/UNIVILLE). Foram realizadas 32 varreduras por amostra na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} , utilizando-se o módulo de reflectância total atenuada (ATR).

4.3.3 Análise termogravimétrica (TGA)

Com o objetivo de conhecer a estabilidade térmica dos compósitos produzidos, foram realizadas análises de TGA. As curvas de TGA serão obtidas em uma termobalança TGA-Q50/TA Instruments (Laboratório de Materiais/UNIVILLE). As amostras serão aquecidas de 25 até 1000°C a 10°C/min sob atmosfera oxidante.

4.3.4 Difractometria de raios -X (DRX)

Para permitir a identificação da cristalinidade e das fases presentes na amostra a análise foi realizada em um difratômetro (Bruker XRD 8 Advance) no laboratório da Universidade de São Carlos, usando radiação $\text{CuK } \alpha$ 1,5418 com 1000 W de potência, 40 kV, 25 mA e detector digital de 160 canais. O ângulo de dispersão 2θ cobriu a faixa de estudo de 5 ° a 70 ° a 0,02 °/s.

4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV) com Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS)

Para avaliar as características superficiais e a dispersão das apatitas utilizadas nas membranas produzidas, foi realizada a análise de MEV/EDS no laboratório da Universidade de São Carlos. As membranas foram fixadas em um suporte metálico, recobertas com ouro e observadas no microscópio MEV – FEI Inspect S 50 com 20 kV de tensão de aceleração.

4.4 ENSAIO DE PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

O ensaio de propriedades antibacterianas foi realizado pela técnica de difusão em disco de Bauer et al. (1966), utilizando-se o meio Müller Hinton (MH) com os micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* ativados por 24 h a uma temperatura de 37 °C, em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI).

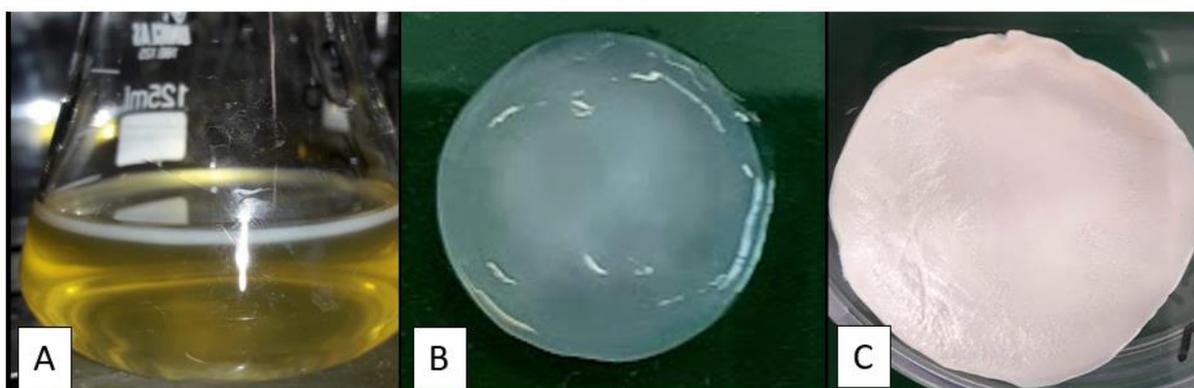
Foi utilizada a escala Mac Farland como base para determinar a concentração de células dos micro-organismos avaliados, padronizando a absorvância em 0,28 (de acordo com o tubo 0,5 da escala Mac Farland). Para a inoculação, utilizou-se um *swab* para possibilitar a formação de um tapete do micro-organismo na placa de Petri. Em seguida, os discos das membranas já funcionalizadas foram dispostos sobre as células inoculadas e as placas foram colocadas em incubadora por 24 h e 37 °C; o ensaio foi conduzido em duplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE DA MEMBRANA DE CB

Decorridos nove dias de incubação da bactéria *Komagataeibacter hansenii* foi possível observar a formação das membranas de CB na superfície do meio de cultivo líquido, apresentando uma espessura média de $1,27 \text{ mm} \pm 0,01$ (Figura 4–A). Para se realizar todas as análises deste trabalho, foram sintetizadas 50 membranas de CB. Após o processo de purificação, a membrana de CB pura apresentou um aspecto gelatinoso e translúcido (Figura 4–B). A liofilização da CB, por sua vez, trouxe uma característica mais esponjosa à membrana (Figura 4-C).

Figura 4 - Membranas de CB: A) síntese; B) purificação; C) liofilização



5.2 PRODUÇÃO DOS BIOCOMPÓSITOS

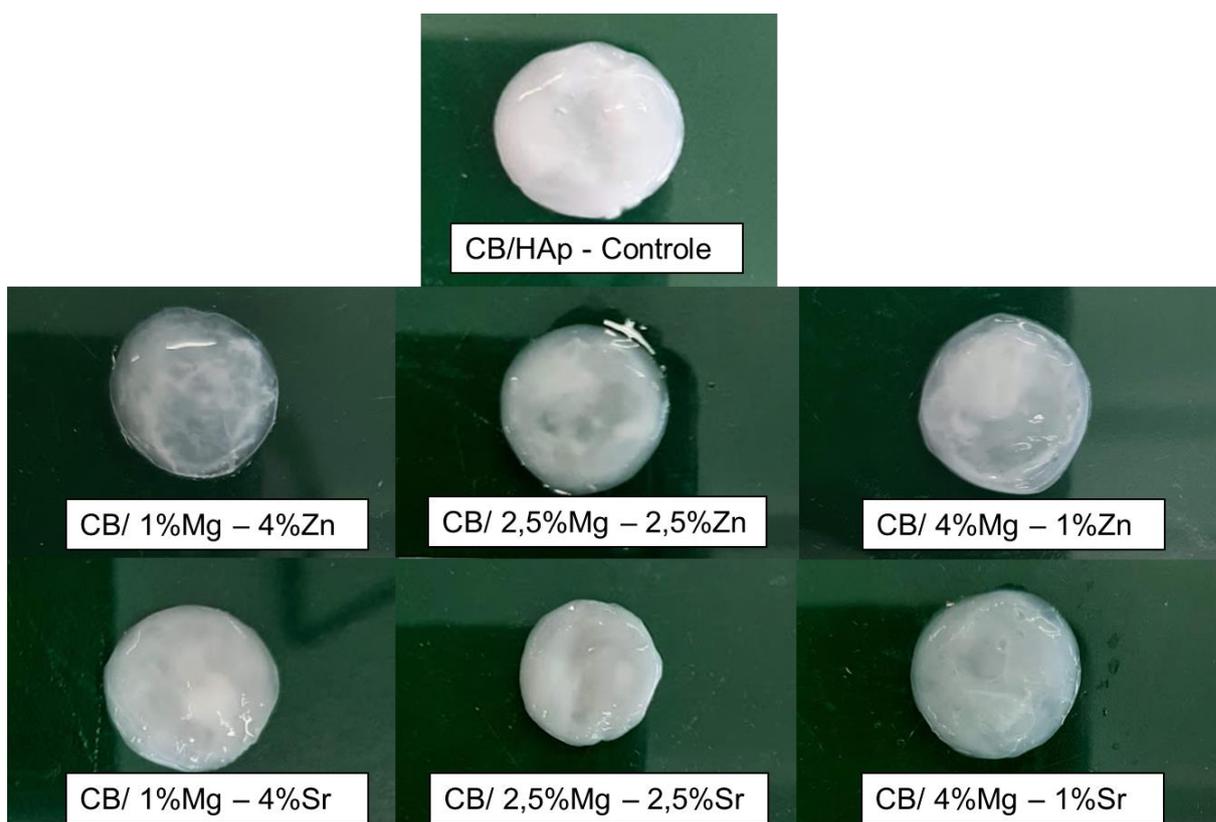
Os biocompósitos foram produzidos por meio de ciclos de imersão. Para se incorporar os íons Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} e Sr^{+2} , as membranas de CB foram imersas em soluções híbridas de CaCl_2 , MgCl_2 e ZnCl_2 ; ou CaCl_2 , MgCl_2 e SrCl_2 , e para finalizar a formação da hidroxiapatita, as membranas foram imersas na solução de Na_2HPO_4 , desta forma, a HAp parcialmente substituída por Mg/Zn e Mg/Sr foi incorporada no biocompósito.

Para a amostra controle, houve apenas a incorporação dos íons Ca^{+2} e do grupo fosfato.

Pode-se observar uma certa distinção na coloração nos biocompósitos produzidos conforme a alteração da concentração dos íons. Ressalta-se que na

Figura 4-B a 4B pura possui uma característica de um hidrogel claro e translúcido, diferente dos biocompósitos produzidos com HAp, os quais apresentaram uma coloração mais branca e densa, conforme pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 - Biocompósitos produzidos em soluções híbridas de imersão com concentrações diferentes



Com a intenção de manter a integridade dos poros dos biocompósitos, estes foram liofilizados e posteriormente caracterizados. De acordo com Garcia (2022), a liofilização dos biomateriais produzidos a base de CB deve ser realizada para garantir a integridade dos poros e fornecer um ambiente viável à adesão e migração celular do material implantado. Em se tratando de porosidade, quanto mais poroso o material for, mais permeável ele será, facilitando assim, a vascularização, o transporte de nutrientes para as células e sua troca gasosa, e possibilitando o sucesso da regeneração do tecido (KIM et al., 2015).

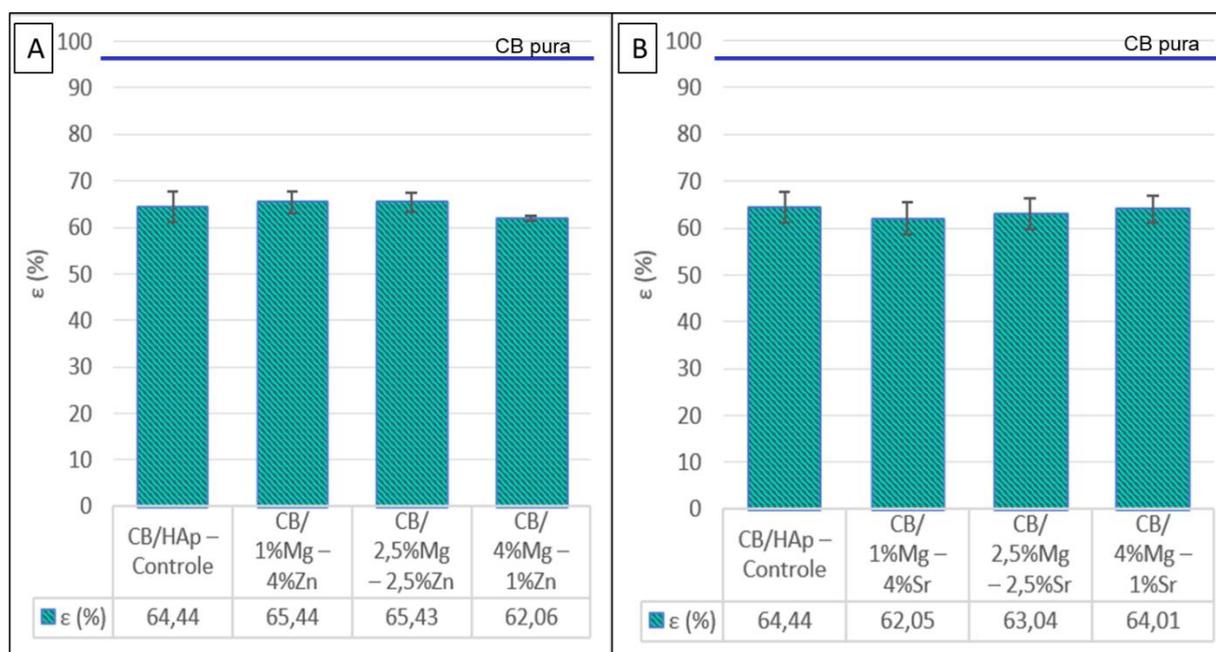
5.3 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO

5.3.1 Determinação da porosidade

Conforme Garcia (2022), determinar a porosidade dos biocompósitos pode auxiliar na interpretação dos resultados das demais caracterizações realizadas, visto que os poros favorecem os fenômenos de adsorção.

Para se calcular o percentual de porosidade (ϵ), as amostras foram pesadas úmidas e secas, e os cálculos foram realizados com base nas Equações 1 e 2 (página 26). A Figura 6 demonstra o gráfico contendo os valores médios da porosidade calculada.

Figura 6 – Valores médios de porosidade média dos biocompósitos: A) CB/HAp Mg-Zn; e B) CB/HAp Mg-Sr



A CB pura apresenta uma alta porosidade, indicada por uma linha azul na Figura 6, podendo chegar a 96% (GARCIA, 2022) e 98% (HUANG et al., 2017). Porém, quando a hidroxiapatita é incorporada na superfície das fibras da CB, ocorre uma diminuição de 34% da porosidade das amostras. Alguns estudos apontam que os *scaffolds* de um biomaterial ideal devem apresentar uma estrutura porosa interconectada que auxilie no fornecimento de nutrientes e que promova a migração celular para a formação de novos tecidos (GARCIA, 2022; HUANG et al., 2017).

Conforme Jin et al. (2012), o aumento da massa da HAp pode ocasionar a diminuição dos poros da matriz, além de eventualmente ocorrer aglomerações na estrutura dos poros. Mesmo assim, espera-se que os biocompósitos formados pela técnica de imersão continuem apresentando boa porosidade (GARCIA, 2022).

Após a incorporação das HAp parcialmente substituídas por Mg-Zn e Mg-Sr, os biocompósitos apresentaram porosidade média 64%, e se observou que a concentração de íons metálicos não apresentou influência direta nos valores de porosidade, porém, houve um decréscimo de 34% em seus percentuais em relação à CB pura, conforme o material inorgânico foi depositado na superfície, este fato também foi observado por Garcia (2022) e Huang e colaboradores (2017).

Os resultados obtidos sugerem que a deposição da HAp ocorreu na superfície e também no interior da CB, já que o decréscimo do percentual de porosidade indica a deposição dos cristais de HAp nas fibras da CB. Mesmo assim, os biocompósitos produzidos mantiveram um percentual de porosidade adequado, fato que permite a passagem de células e até medicamentos para o local lesionado. Conforme Recouvreux (2008), para ser utilizado no tratamento de defeitos ósseos, o biomaterial ideal deve permitir a migração das células na regeneração óssea, e este fato é alcançado por meio da sua porosidade. Garcia (2022), também concorda e acrescenta que esta característica é essencial para os biomateriais implantáveis, pois contribui na distribuição dos nutrientes para a área lesionada. Ainda que os resultados obtidos indiquem a diminuição da porosidade dos biomateriais produzidos em comparação com a CB pura, os mesmos ainda podem ser aplicados na regeneração óssea, já que a HAp incorporada favorece a reconstrução do tecido danificado.

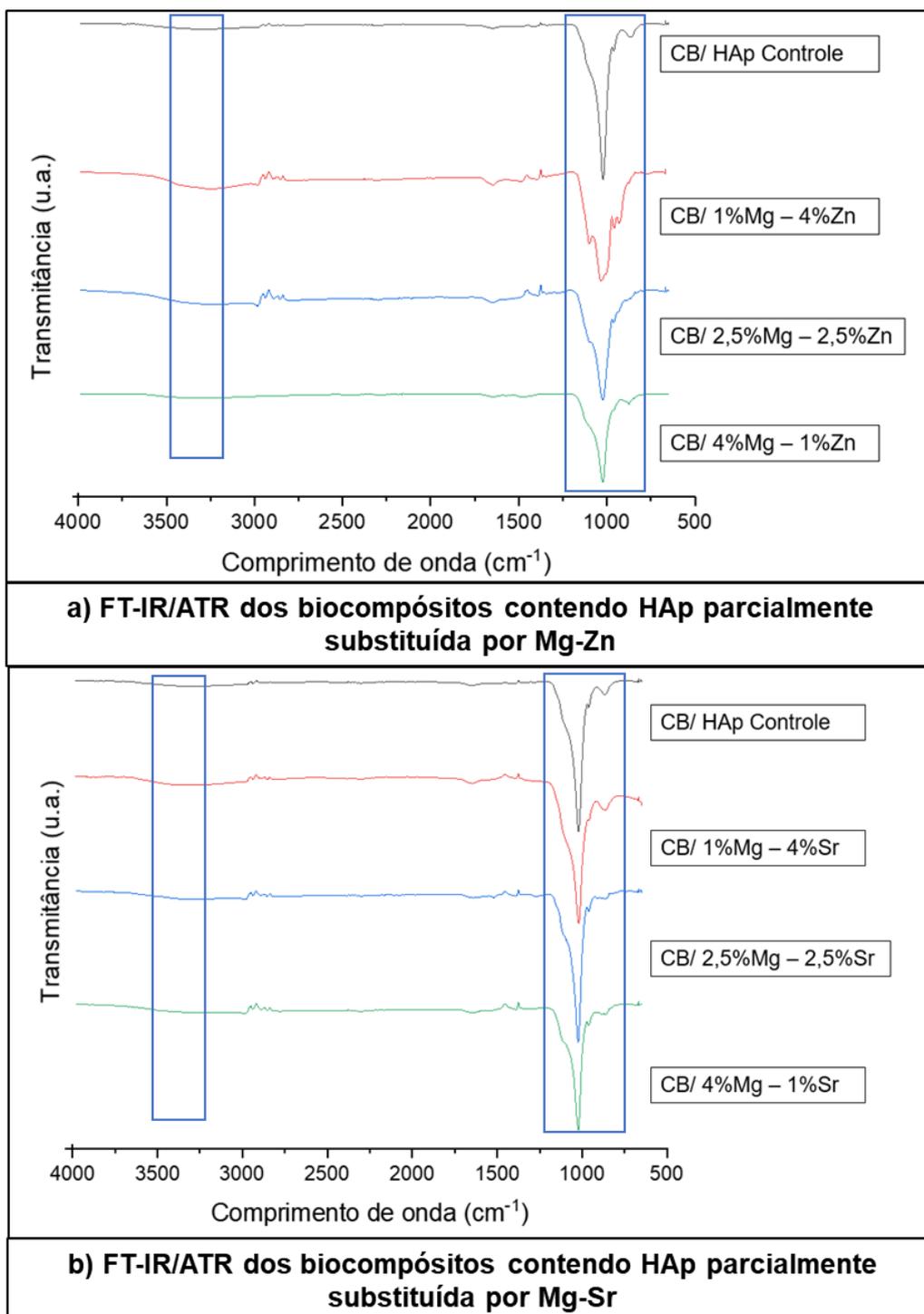
5.3.2 Análise Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (FTIR/ATR)

A Figura 7 ilustra a comparação entre os espectros de FTIR de amostras de CB/HAp Controle, CB/HAp Mg/Zn e CB/HAp Mg/Sr em diferentes concentrações, afim de identificar compostos químicos presentes.

Conforme a literatura, o espectro característico da CB pura obtido nas análises de FT-IR contém bandas marcantes na região entre 3500 - 3200 cm^{-1} as quais são típicas do alongamento do grupo hidroxila e também das ligações de hidrogênio (WAN et al., 2007). Além do alongamento da ligação C-H em 2998 cm^{-1} , absorvância de H_2O

em 1649 , deformação CH_2 em 1428 cm^{-1} , deformação de C-H (grupo CH_3) ou O-H no plano em 1370 e 1335 cm^{-1} , bem como o alongamento da ponte antissimétrica C-O-C em 1161 cm^{-1} e alongamento da ligação C-O em 1110 cm^{-1} (AN et al., 2017; HUANG et al., 2017; RECOUVREUX, 2008; WAN et al., 2007).

Figura 7 - Análise de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR/ATR) dos biocompósitos: A) CB/HAp Mg/Zn; e B) CB/HAp Mg/Sr



A Tabela 2 aponta os comprimentos de onda fornecidos pela literatura para os grupos funcionais característicos das membranas CB pura e CB funcionalizada com HAp. Também é possível observar bandas que foram identificadas nos biocompósitos produzidos.

Tabela 2 - Bandas observadas na análise de FTIR/ATR para os biocompósitos

Tipo de ligação	CB/HAp Controle	CB/ 1%Mg – 4%Zn	CB/ 2,5%Mg – 2,5%Zn	CB/ 4%Mg – 1%Zn	CB/ 1%Mg – 4%Sr	CB/ 2,5%Mg – 2,5%Sr	CB/ 4%Mg – 1%Sr	Comprimento de onda característico da literatura (cm ⁻¹)	Referência Literária
Grupo O-H	3309	3429	3419	3457	3424	3357	3288	3500 - 3200	(Wan et al., 2007)
Grupo C-H deformação (CH ₂ e CH ₂)	2977	2981	2982	---	2936	2980	2982	2998	(An et al., 2017)
Grupo H-O-H	1652	1647	1646	1648	1650	1642	1644	1649	(Recouvreux, 2008)
Deformação H-C-H	1415	1431	1437	1464	1432	1433	1433	1428	(Huang et al., 2017)
Deformação C-H (grupo CH ₃), ou O-H no plano	1364	1368	1366	---	1396	1394	1388	1370	(Recouvreux, 2008)
Deformação C-H (grupo CH ₃), ou O-H no plano	1331	1340	1339	---	1352	1368	1365	1335	(Recouvreux, 2008)
Alongamento da ponte antissimétrica C-O-C	---	---	---	1128	---	1148	---	1161	(Huang et al., 2017)
Alongamento C-O	1111	1102	1105	1095	1100	1111	1113	1110	(Huang et al., 2017)
Alongamento grupo fosfato	1023	1033	1024	1024	1021	1026	1023	1030	(Wan et al., 2007)
Grupo fosfato	960	959	961	962	960	961	961	962	(Hutchens et al., 2006)
Grupo CO ₃ ⁻²	870	873	884	873	869	866	863	880	(Boyd et al., 2015)

Nos biocompósitos produzidos, bem como na amostra controle, foi possível observar uma leve curvatura da banda na região entre 3500 – 3200 cm⁻¹, indicando a presença do grupo hidroxila oriundo da CB. Esta presença mais branda de hidroxilas, pode indicar um amplo recobrimento de HAp sobre a matriz da CB, sugerindo sua mineralização (WAN et al., 2007). A interação entre a CB e a HAp ocorre por meio de

ligações de hidrogênio, as quais são responsáveis por manter a integridade mecânica do biocompósito, fator essencial para a substituição óssea (DONINI et al., 2010b; GARCIA, 2022; SASKA et al., 2011).

Outro fator de destaque nos biocompósitos produzidos é a ausência de bandas marcantes em 1160 e 1110 cm^{-1} , os quais correspondem, respectivamente, aos modos de alongamento da ponte antissimétrica C-O-C e do alongamento da ligação C-O. Nas amostras analisadas, estas bandas apareceram apenas no ombro do pico posterior mais significativo. Este fato também foi observado por Grande et al. (2009) e Garcia (2022), os quais afirmaram que as intensidades reduzidas nestas bandas indicam uma boa ligação entre a CB e a HAp, melhorando a estabilidade do biocompósito.

Em todos os espectros foi possível observar a presença de bandas marcantes em 1030 e 962 cm^{-1} , sendo estes correspondentes aos modos vibracionais das ligações P-O, indicando a presença do grupo fosfato nos biomateriais produzidos (HUTCHENS et al., 2006; WAN et al., 2007). Hutchens et al (2006) sintetizaram um biomaterial a base de CB dopada com hidroxiapatita e em suas análises apresentaram bandas entre 957 e 1056 cm^{-1} , confirmando a presença do modo vibracional do grupo fosfato, os quais podem se sobrepor aos grupamentos da membrana de CB nos comprimentos de onda entre 1000 e 1100 cm^{-1} .

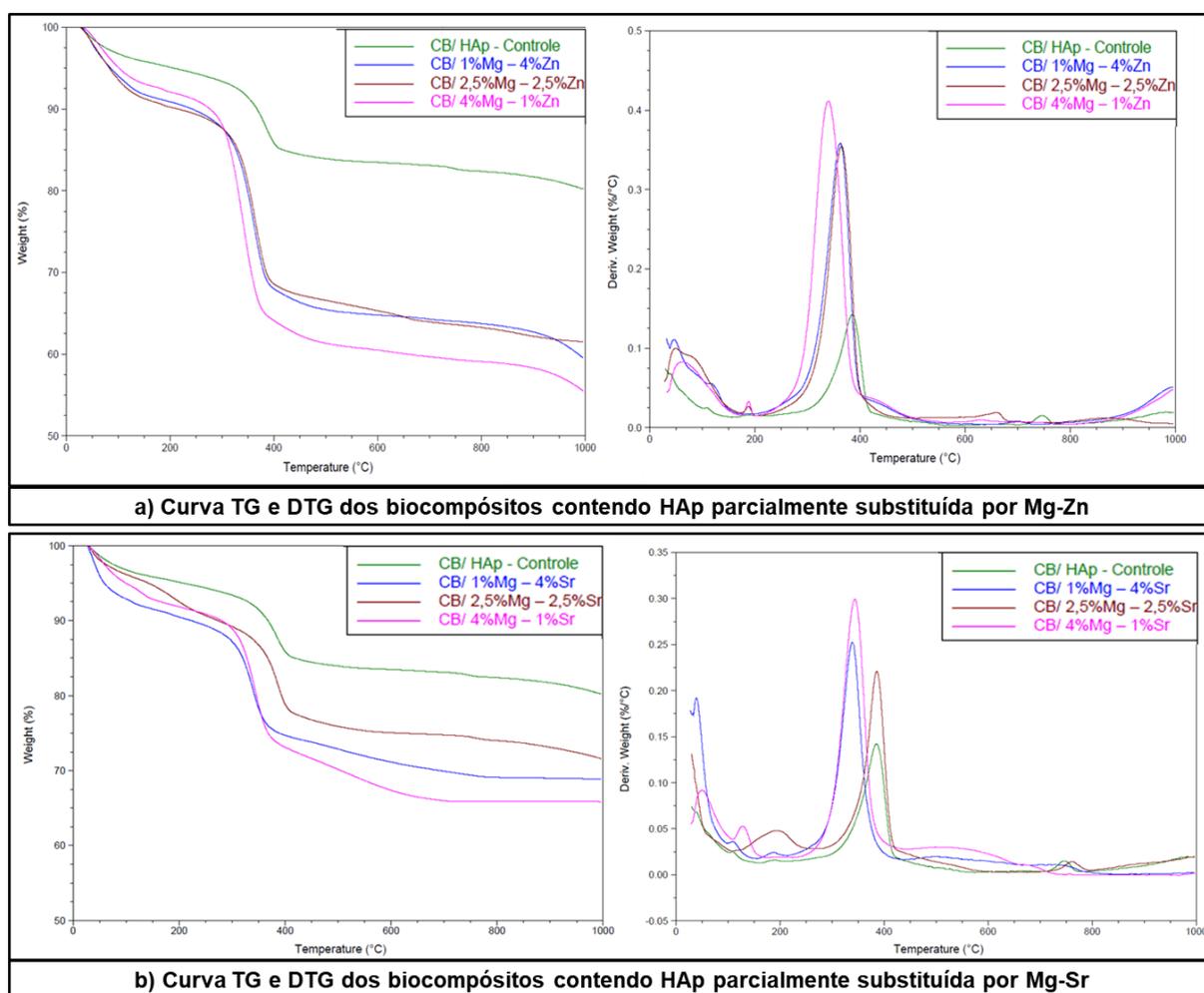
Outra banda que apresentou relevância nas amostras analisadas está localizada em 880 cm^{-1} , a qual corresponde ao íon carbonato (CO_3^{2-}), sugerindo a absorção do gás carbônico presente no ar, visto que a produção dos biocompósitos ocorreu perante condições atmosféricas (BOYD et al., 2015; GARCIA, 2022). Conforme Saska et al. (2011), que avaliaram os biocompósitos a partir de CB e HAp para regeneração óssea, a presença de uma apatita contendo carbonato nas fibras da CB, produz um material semelhante à apatita do tecido ósseo. Já Almeida et al. (2019) que estudaram partículas de HAp para substituição óssea, também apresentaram íons carbonato na apatita, e sugeriram que este fator contribui no aumento da resistência mecânica e na bioatividade no material.

Em suma, os biocompósitos produzidos apresentaram uma presença mais branda no grupo hidroxila, indicando o recobrimento da CB pela HAp. A banda que indica a existência de ligações entre P-O também foi observada para todas as amostras analisadas. Além disso, foi possível identificar bandas correspondentes ao grupo carbonato, sugerindo a produção de apatitas carbonatadas.

5.3.3 Análise termogravimétrica (TGA)

O perfil de degradação térmica da amostra controle CB/HAp e dos demais biocompósitos produzidos está apresentado na Figura 8. Nos resultados é possível observar a presença de 5 estágios de perda de massa para a maioria das amostras. A Tabela 3 apresenta os dados de temperatura máxima de degradação ($T_{m\acute{a}x}$) e a porcentagem de perda de massa para cada estágio de degradação.

Figura 8 - Curva TG e DTG dos biocompósitos: a) CB/HAp Mg-Zn; b) CB/HAp Mg-Sr



Todas as amostras analisadas apresentaram uma perda de massa inicial de até 10%, nas temperaturas que variaram entre 50 e 110 °C. Esta perda inicial se refere à desidratação da celulose ou então a perda de voláteis (ARAÚJO et al., 2018; GARCIA, 2022).

Tabela 3 - Dados referentes à temperatura máxima de degradação ($T_{\text{máx}}$) e porcentagem de perda de massa (M %) obtidos das curvas TG e DTG dos biocompósitos produzidos

Amostra	M_1 (%)	M_2 (%)	$T_{\text{máx}} 2$ (°C)	M_3 (%)	$T_{\text{máx}} 3$ (°C)	M_4 (%)	$T_{\text{máx}} 4$ (°C)	M_5 (%)	$T_{\text{máx}} 5$ (°C)	Resíduo (%)
CB/HAp – Controle	5,64	---	---	10,82	385,5	1,25	745,9	2,16	888,5	80,30
CB/ 1%Mg – 4%Zn	10,18	---	---	24,76	362,9	---	---	5,48	864,5	59,56
CB/ 2,5%Mg – 2,5%Zn	8,68	1,94	201,9	23,4	365,3	2,35	660,9	2,1	879,4	61,51
CB/ 4%Mg – 1%Zn	6,88	2,03	204,1	30,21	340,1	---	---	5,35	853,2	55,56
CB/ 1%Mg – 4%Sr	8,39	1,64	187,9	17,99	339,1	---	---	3,09	821,9	68,85
CB/ 2,5%Mg – 2,5%Sr	4,80	4,50	196,3	15,35	386,0	1,33	760,8	2,35	928,4	71,65
CB/ 4%Mg – 1%Sr	5,02	3,13	129,6	23,17	344,1	---	---	2,84	732,6	65,84

Um segundo estágio muito tênue foi observado nas temperaturas entre 130 e 205 °C para os biocompósitos, exceto na amostra controle e na amostra CB/ 1%Mg – 4%Zn. Esta perda de massa de do máximo 4,5%, pode ser atribuída à vaporização da água de cristalização da HAp, ou pode estar associado a uma perda hídrica posterior (GARCIA, 2022; SASKA et al., 2011).

O terceiro estágio de degradação é o mais marcante e ocorreu nas temperaturas entre 340 - 386 °C, com uma perda de massa variando entre 10% para a amostra controle, e chegando no valor máximo de 30% para a amostra CB/ 4%Mg – 1%Zn. Este evento térmico é característico da degradação da CB, ocasionando a despolimerização e desidratação da mesma, resultando em resíduos carbonáceos (GARCIA, 2022; SASKA et al., 2011). Outros autores também afirmam que a queima da CB produz dióxido de carbono, água e outros resíduos de carbono (ARAÚJO et al., 2018). Conforme a literatura, a degradação da CB pura ocorre em uma temperatura em torno de 300 °C (AN et al., 2017; BARUD et al., 2008; CAMARGO, 2018; GARCIA, 2022); já os biocompósitos em questão apresentaram este estágio em uma temperatura superior (Tabela 3) indicando uma estabilidade térmica mais elevada em comparação à CB pura.

As amostras de CB/HAp – Controle, CB/2,5%Mg – 2,5%Zn e CB/2,5%Mg – 2,5%Sr, apresentaram um estágio de degradação adicional e todas as amostras analisadas exibiram um quinto evento térmico. Estes últimos estágios ocorreram numa faixa de temperatura entre 660 e 930 °C, com uma porcentagem de perda de massa de no máximo 5,48%. Estes eventos são referentes à perda de resíduos carbonáceos da CB e também à perda de massa da apatita carbonatada que está presente nos

biocompósitos (GARCIA, 2022; OFUDJE et al., 2019; ZHANG et al., 2009). Este resultado concorda com os dados obtidos na análise de FTIR, onde os espectros demonstraram a presença de íons carbonatos na apatita.

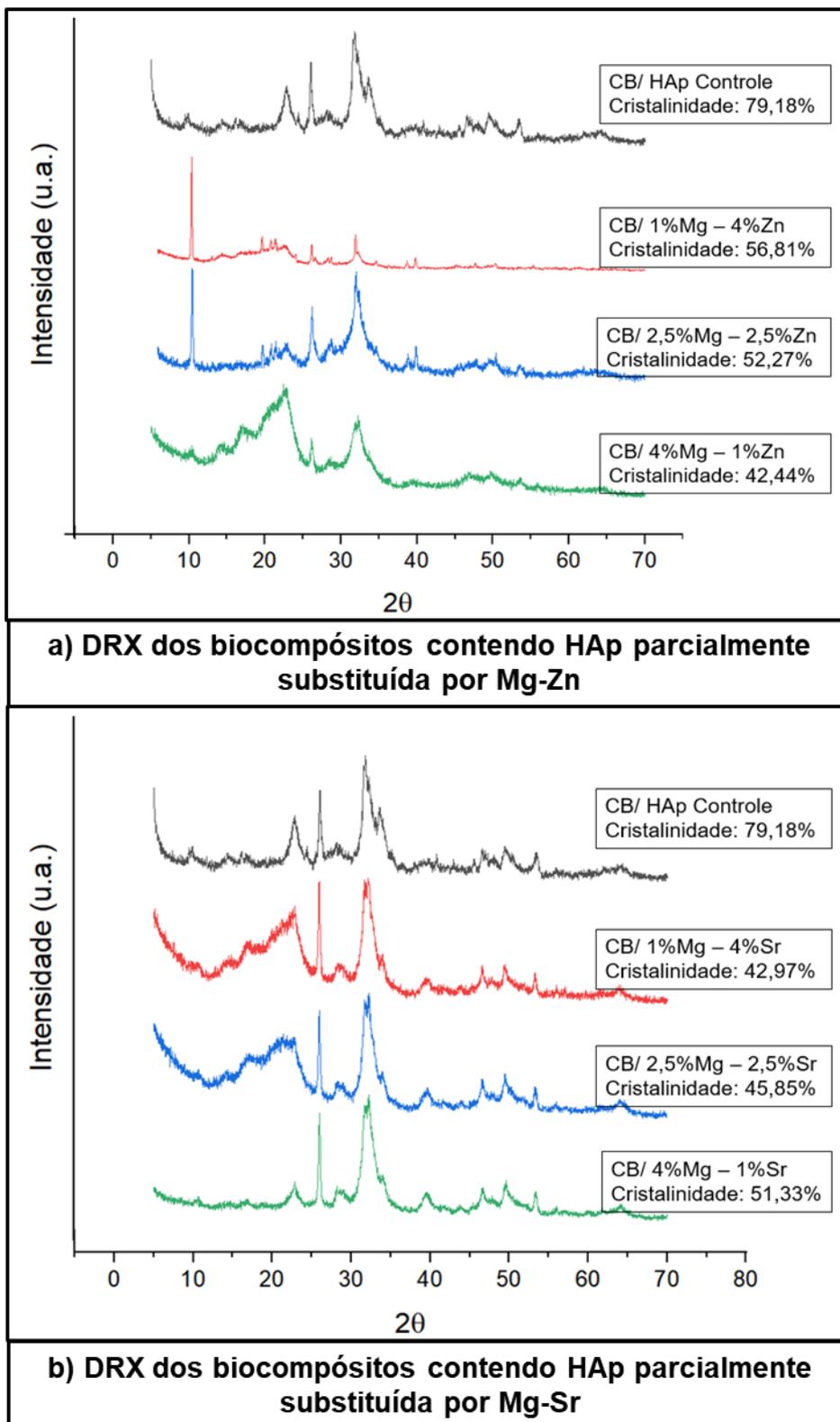
É importante ressaltar que todas as amostras apresentaram um alto percentual de resíduos (55,56% - 80, 30%), confirmando a presença de uma fase inorgânica nos biocompósitos, devido a deposição da HAp nas fibras da CB. Conforme Ofudje e colaboradores (2019), a HAp dopada com Zn apresenta uma perda de massa superior à HAp pura, já que o ponto de ebulição da HAp é maior que o Zn. Este fato também foi observado nos biocompósitos produzidos, onde as amostras contendo HAp parcialmente substituída por Zn apresentam uma perda de massa mais elevada. No geral, biocompósitos com HAp parcialmente substituída por outros íons metálicos apresentam este comportamento quando comparados à biocompósitos contendo HAp pura (GARCIA, 2022).

5.3.4 Difractometria de raios-X (DRX)

A análise de difratometria de raios-X foi utilizada para caracterizar a cristalinidade e a composição de fases das amostras de CB contendo HAp parcialmente substituída por Mg/Zn (Figura 9a) ou Mg/Sr (Figura 9b).

Pelo fato de a CB não ser um material totalmente cristalino, seus resultados podem apresentar picos de difração com bases largas, sugerindo a presença da região amorfa nas amostras. Já nos biocompósitos dopados com íons metálicos, os picos de base larga indicam que o material é composto por pequenos cristais de HAp (PATERNO; SILVEIRA; PEZZIN, 2018). Os difratogramas dos biocompósitos parcialmente substituídos apresentaram uma diminuição no grau de cristalinidade, quando comparados à amostra controle CB/HAp, indicando que a substituição parcial do íon Ca por Mg/Zn ou Mg/Sr acarretou em uma redução de 30% em média, no grau de cristalinidade dos mesmos, este fato também foi observado por Dias (2020).

Figura 9 - Difratomogramas de raios - X dos biocompósitos CB/HAp: a) Parcialmente substituídos por Mg/Zn e b) Parcialmente substituídos por Mg/Sr



A CB possui dois picos de difração muito característicos, localizados em $2\theta \approx 14,5$ e $22,6^\circ$ (GARCIA, 2022). O segundo pico foi observado em todas as amostras

analisadas; já o primeiro não foi observado na amostra CB/HAp 2,5%Mg-2,5%Zn e CB/HAp 4%Mg-1%Sr.

Já a HAp apresenta picos de difração em $2\theta \approx 26^\circ$ e 32° . Outros picos de menor intensidade também são típicos da HAp e estes são encontrados em $2\theta \approx 33^\circ$, 40° , 46° e 54° (GARCIA, 2022; GRANDE et al., 2009). Todos os biocompósitos produzidos demonstraram estes picos característicos da HAp, confirmando a incorporação das fontes de fosfato nas fibras da CB, algo que também foi observado nas análises de FTIR.

Nos biocompósitos modificados com Mg/Sr, a intensidade do pico $2\theta \approx 26^\circ$ foi observada em comparação com a CB/HAp-Controle, indicando uma elevação da cristalinidade do material (GARCIA, 2022). Este fato não foi observado nos biocompósitos modificados com Mg/Zn.

Conforme a literatura, picos apresentados em $2\theta \approx 27,74^\circ$, $30,89^\circ$ e $34,12^\circ$ estão associados à fase cristalina da whitlockita ($\text{Ca}_{18}\text{Mg}_2\text{H}_2(\text{PO}_4)_{14}$), a qual é resultante de um processo onde o cálcio das fontes de fosfato é substituído por pequenas quantidades de magnésio (GIANNOULATOU et al., 2018). Nos biocompósitos analisados foi possível observar picos muito sutis em $2\theta \approx 34,12^\circ$, provavelmente devido às baixas concentrações utilizadas.

Nos estudos de Wang et al. (2018), foram encontrados dois novos picos nos resultados dos materiais dopados com Zn, sendo eles em $2\theta \approx 31,7^\circ$ e $34,7^\circ$. No entanto, neste estudo só foi possível observar o pico em $31,7^\circ$ para os biocompósitos contendo 2,5% e 1% de Zn, e mesmo assim estes se apresentam com bases largas.

Nas amostras dopadas com Mg/Sr foi possível observar um pico em $2\theta \approx 31,8^\circ$, o qual era mais significativo nas amostras contendo uma concentração maior de Sr, este fato também foi observado por Garcia (2022). No entanto, neste projeto estes picos também possuem bases largas.

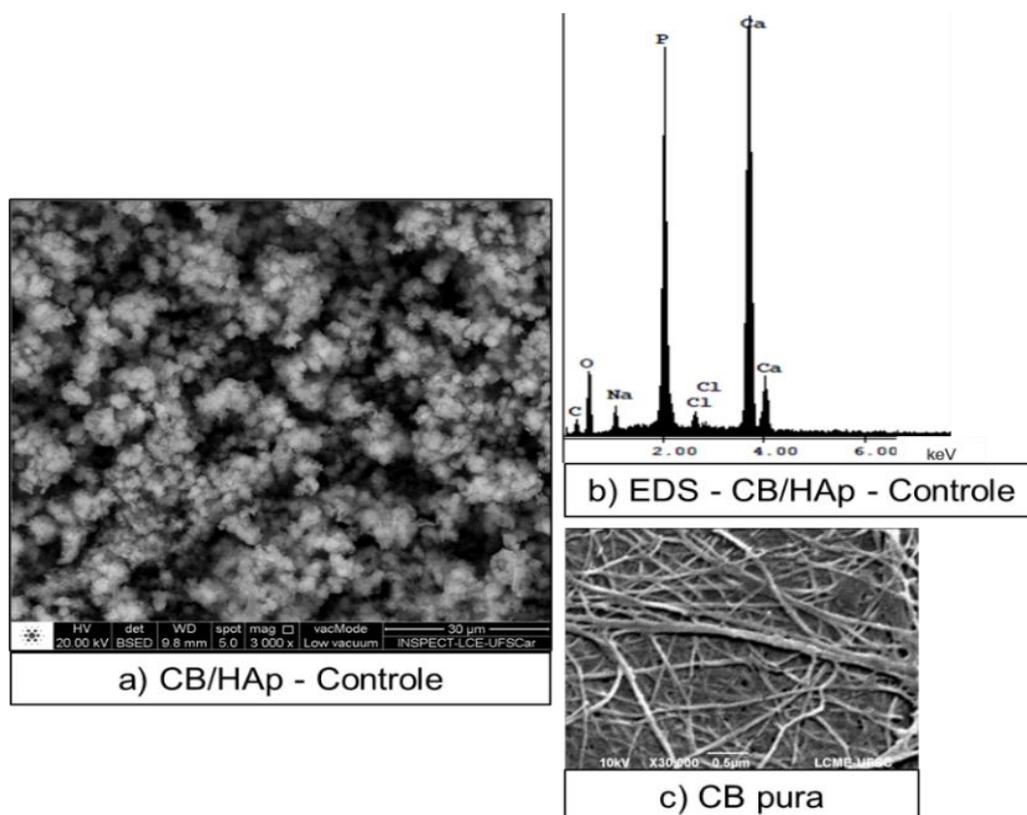
5.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV) com Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS)

Conforme Recouvreux (2008), a CB pura é composta por uma matriz densa e homogênea de longas fibras de celulose. A Figura 10-c, permite a visualização morfológica da estrutura da CB pura, já a Figura 10-a apresenta a micrografia do biocompósito controle, formado pela CB e recoberta por HAp.

Observa-se uma densa camada de cristais de HAp sobre a superfície da CB, as quais se encontram em formato relativamente globular ou ainda na forma de rosetas e lâminas, indicando que a mineralização do biocompósito foi eficaz. Comparando-se ambas micrografias, CB/HAp-Control e CB pura, é possível verificar que houve a deposição dos cristais nas nanofibras de celulose. Conforme os estudos de Luz (2016), que avaliou materiais híbridos a base de CB e Sr, as amostras contendo apenas HAp incorporada na CB apresentaram cristais em uma forma levemente globular; e este fato também foi observado para a amostra controle deste trabalho.

A análise de EDS para o biocompósito controle (Figura 10-b) confirmou a presença dos elementos Ca e P, os quais são responsáveis pela formação dos cristais de HAp, fato que também foi confirmado por Garcia (2022).

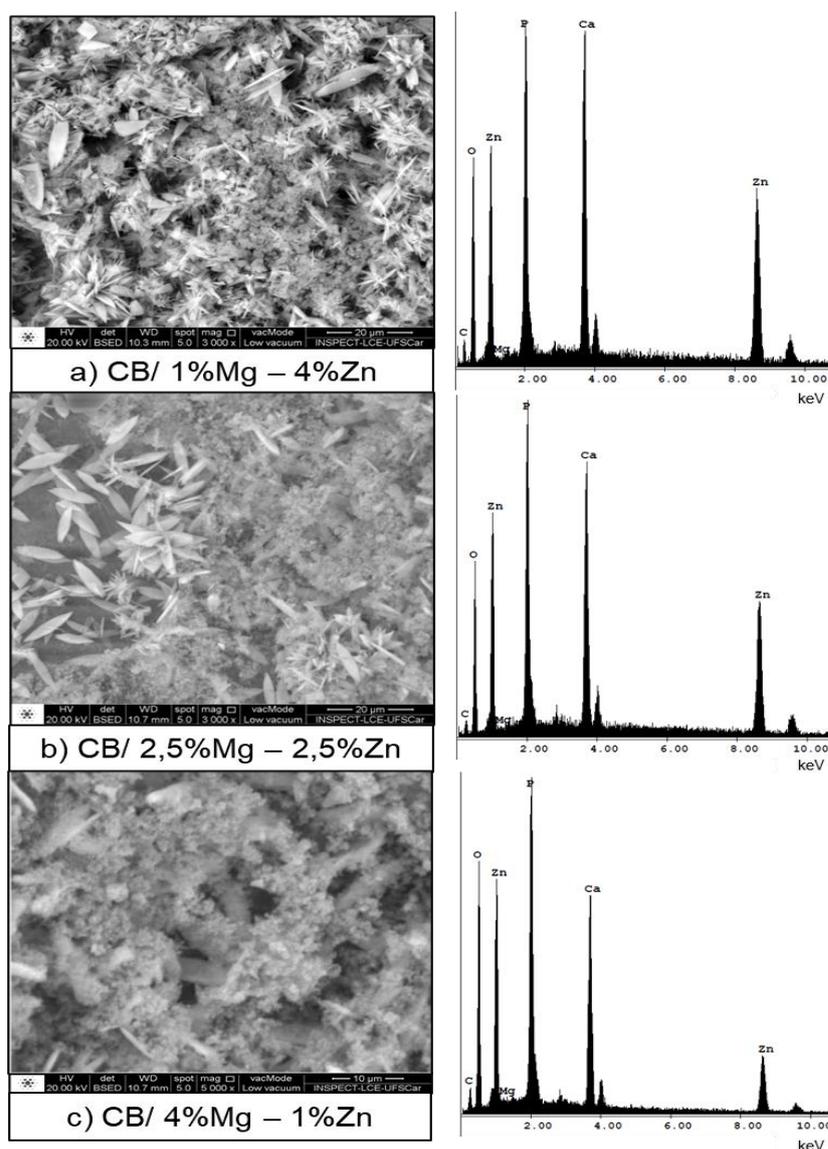
Figura 10 - Micrografias de superfície da A) CB/HAp - Controle; B) EDS do biocompósito controle e C) CB pura



A substituição parcial dos íons Ca pelo híbrido Mg-Zn alterou levemente a morfologia dos cristais (Figura 11), em comparação com a amostra controle. As amostras que foram dopadas com Mg-Zn apresentaram cristais com uma morfologia

de agulha e lamelar que recobriu toda a superfície das nanofibras da CB. Observou-se que quanto maior a concentração de Zn nas amostras, maior é a presença de cristais da forma de agulha.

Figura 11 - Micrografias de superfície e análises de EDS dos biocompósitos incorporados com HAp parcialmente substituída por Mg-Zn



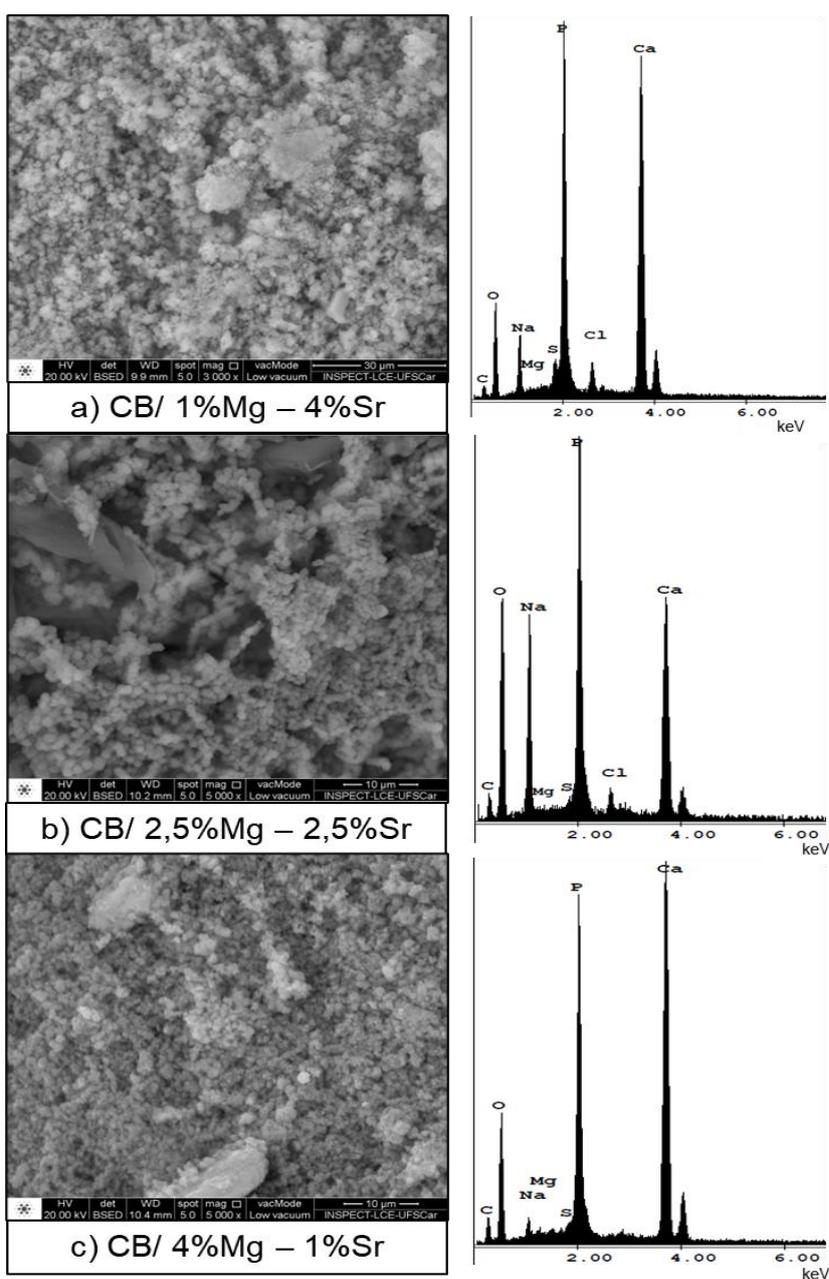
Conforme a literatura, o pH mais ácido favorece a formação de cristais de HAp no formato de placas, lâminas ou pétalas. Como as soluções utilizadas no primeiro ciclo de imersão continuam pH 6, justifica-se a morfologia apresentadas pelos biocompósitos dopados pelo híbrido Mg-Zn (NETO, 2015).

A análise de EDS confirmou a presença dos elementos Ca, Mg, Zn, P para cada uma das amostras analisadas (Figura 11). Ressalta-se que a detecção dos elementos

carbono (C) e oxigênio (O) está relacionada com a apatita carbonatada, corroborando com os resultados obtidos pela análise de FTIR.

As amostras contendo HAp parcialmente substituída por Mg-Sr apresentaram a morfologia semelhante à amostra controle (Figura 12), fato também observado por Luz (2016) e Garcia (2022), indicando que a incorporação não afetou a forma estrutural da CB.

Figura 12 - Micrografias de superfície e análises de EDS dos biocompósitos incorporados com HAp parcialmente substituída por Mg-Sr



Uma densidade elevada de cristais no formato de lâminas levemente globulares foi observada em todas as amostras dopadas com Mg-Sr, além disso, a formação dos cristais nas fibras da CB ocorreu de forma uniforme e homogênea.

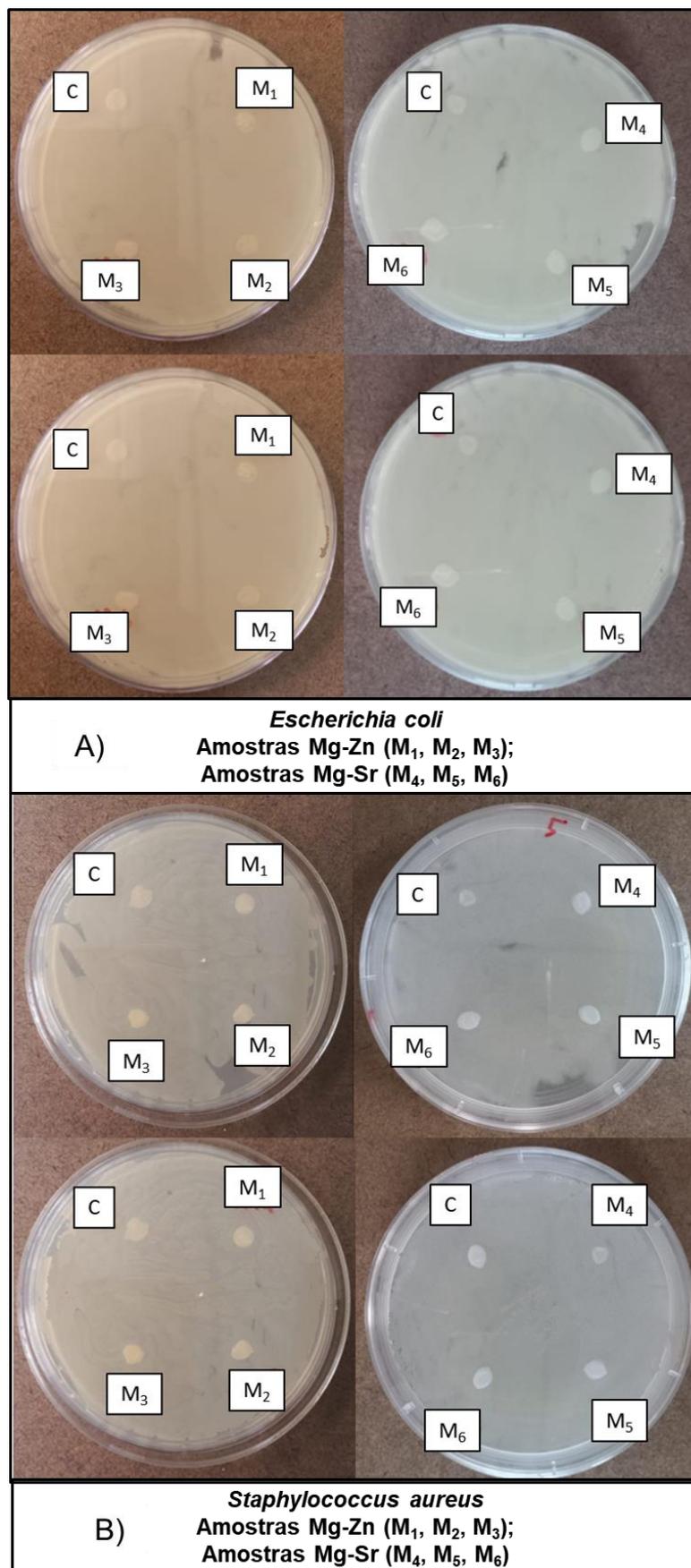
A análise de EDS para os biocompósitos contendo Mg-Sr confirmou a presença dos elementos Ca, Mg, Sr, P para cada uma das amostras analisadas (Figura 12). Os elementos C e O também foram detectados, confirmando a presença da apatita carbonatada nas amostras. Conforme (GARCIA, 2022), a carbonatação da apatita torna o biocompósito biologicamente superior em comparação com a HAp pura, beneficiando a biocompatibilidade do material. Além dos elementos já mencionados, os biocompósitos em questão também continham traços de sódio (Na) e cloro (Cl), os quais são atribuídos aos resíduos das soluções de imersão que foram utilizadas no processo de mineralização (CaCl_2 e Na_2HPO_4).

5.4 ENSAIO DE PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

Os micro-organismos que podem causar infecções após a cirurgia de reparação óssea são o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (Gram-positivas); *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (Gram-negativos) (HIDALGO-ROBATTO et al., 2018). Hetrick e Schoenfisch (2006) complementam quando afirmam que o *S. aureus* causa infecções mais graves e estas são formadas mais rapidamente do que as infecções causadas pelo *S. epidermidis*.

A Figura 13 apresenta as placas contendo as amostras produzidas, as quais foram analisadas em dois micro-organismos diferentes (*E. coli* e *S. aureus*). No entanto, nenhum biocompósito apresentou ação antibacteriana, ou seja, nenhum halo de inibição de crescimento das bactérias foi observado. Tal fato pode ser justificado pela baixa concentração dos elementos Mg, Zn e Sr que foram utilizados.

Este resultado já foi observado em outro estudo, no qual nenhum halo foi observado, ou então a ação antimicrobiana obtida foi baixa. Garcia (2022) avaliou as propriedades antimicrobianas para um biocompósito a base de CB com HAp parcialmente substituída por cobre e magnésio, e apenas as amostras contendo cobre apresentaram o halo de inibição para *E. coli* e *S. aureus*.

Figura 13 - Ensaio de ação antimicrobiana do biocompósitos produzidos

Conforme Ai et al. (2020), a HAp é um material inerte e que não demonstra atividade antibacteriana e a baixa concentração dos íons metálicos que foram incorporados à CB pode não ter atingido a concentração inibitória mínima para apresentarem atividade antimicrobiana. Além disso, como foi observado nas imagens de MEV, os cristais de HAp parcialmente substituída por Mg-Zn e Mg-Sr se encontram no interior dos poros da matriz de CB, desta forma, possivelmente os íons metálicos não entraram em contato com os microrganismos, assim os halos de inibição não foram observados.

No entanto, a incorporação destes íons metálicos possibilita a promoção de outras características aos biocompósitos produzidos, desta forma, estes poderão ser utilizados como *scaffolds*.

A incorporação do Mg favorece o crescimento ósseo e sua ausência pode acarretar a fragilidade dos ossos (TAO et al., 2016). Outro estudo propõe que ação do Mg abala a permeabilidade da membrana celular das bactérias, tornando-as mais sensíveis (DEMISHTEIN; REIFEN; SHEMESH, 2019). Além disso, o Mg possui ação anti-inflamatória, o que pode justificar a ausência dos halos de inibição para os biocompósitos (VANNUCHI; MONTEIRO, 2010; XU et al., 2019). O Zn está envolvido em várias funções biológicas e a sua incorporação em *scaffolds* está associada ao aumento da formação óssea e à aceleração da cicatrização das lesões devido às suas propriedades anti-inflamatórias (HASSAN et al., 2022). Já os *scaffolds* com HAp dopada com Sr buscam acelerar a formação óssea da região lesionada e aumentar a massa óssea (LEI et al., 2017).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As membranas de celulose bacteriana se apresentaram como uma boa matriz para a inserção de apatitas metálicas. Os resultados demonstram que os biocompósitos contendo HAp parcialmente substituída mantiveram um bom percentual de porosidade e hidroxilas disponíveis para efetuar ligações. Os dados obtidos também sugerem que a deposição da HAp ocorreu na superfície e no interior da CB.

Os resultados obtidos pela análise de FTIR/ATR indicaram que grupos fosfato foram incorporados na CB, além disso, também foi notada a presença apatita carbonatada nas fibras da CB, originando um biomaterial semelhante à apatita do tecido ósseo. Este fator também contribui no aumento da resistência mecânica e na bioatividade no material. A análise termogravimétrica para os biocompósitos indicou a incorporação de uma fase inorgânica, sugerindo a formação das apatitas metálicas. Os resultados obtidos pela análise de DRX indicaram a presença de cristais de HAp nos biocompósitos produzidos, corroborando com os ensaios de FTIR. As micrografias obtidas com a análise do MEV comprovaram a incorporação dos cristais de HAp nas fibras da CB, também foi observado um amplo recobrimento da HAp sobre a matriz da CB, indicando a sua mineralização.

Nas concentrações estudadas, os biocompósitos produzidos não apresentaram ação antimicrobiana. No entanto, a análise de EDS confirmou a incorporação dos elementos Mg, Zn e Sr nas amostras, e estes, por sua vez, podem proporcionar benefícios ao *scaffold*, promovendo a osteogênese e a regeneração óssea.

Em trabalhos futuros, sugere-se que seja realizado um estudo de citotoxicidade destes biocompósitos, para avaliar o comportamento dos mesmos *in vivo*. Também se sugere novos estudos com HAp parcialmente substituídas por diferentes combinações de íons metálicos, bem como o uso de outras concentrações.

7 REFERÊNCIAS

AI, F.; CHEN, L.; YAN, J.; YANG, K.; LI, S.; DUAN, H.; CAO, C.; LI, W.; ZHOU, K. Hydroxyapatite scaffolds containing copper for bone tissue engineering. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 95, n. 1, p. 168–179, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10971-020-05285-0>>

ALMEIDA, R. S.; PENICHE, C. A.; SOLÍS, Y.; PENICHE, H.; RIGO, E. C. S.; ROSA, F. P. Development, characterization and in vitro evaluation of chitosan and hydroxyapatite particles for bone replacement. **Ceramica**, v. 65, n. 376, p. 569–577, 2019.

AN, S. J.; LEE, S. H.; HUH, J. B.; JEONG, S. I.; PARK, J. S.; GWON, H. J.; KANG, E. S.; JEONG, C. M.; LIM, Y. M. Preparation and characterization of resorbable bacterial cellulose membranes treated by electron beam irradiation for guided bone regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 19, 2017.

ANTÔNIO, R. V.; RECOUVREUX, D. O. S.; NAZARIO, A. C.; TIMBONI, D.; FERRARINI, E.; RODOWANSKI, G. P.; CAUDURO, M. T.; PERES, S. da S. Produção De Celulose Bacteriana a Partir De Diferentes Substratos. Em: SIMPÓSIO DE INTEGRAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DO SUL CATARINENSE – SICT-SUL 2012, **Anais...** : Revista Técnico Científica, 2012. Disponível em: <<https://periodicos.ifsc.edu.br/index.php/rtc/article/view/726>>

ARAÚJO, I. M. S.; SILVA, R. R.; PACHECO, G.; LUSTRI, W. R.; TERCJAK, A.; GUTIERREZ, J.; JÚNIOR, J. R. S.; AZEVEDO, F. H. C.; FIGUÊREDO, G. S.; VEGA, M. L.; RIBEIRO, S. J. L.; BARUD, H. S. Hydrothermal synthesis of bacterial cellulose–copper oxide nanocomposites and evaluation of their antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, p. 341–349, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.081>>

BARUD, H. S.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; MARTINES, M. A. U.; DEXPERT-GHYS, J.; MARQUES, R. F. C.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Bacterial cellulose-silica organic-inorganic hybrids. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 46, n. 3, p. 363–367, 2008.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **The American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 1–5, 1966.

BAUER, L.; IVANKOVIĆ, M.; IVANKOVIĆ, H. MAGNESIUM SUBSTITUTED HYDROXYAPATITE SCAFFOLDS HYDROTHERMALLY SYNTHESIZED FROM CUTTLEFISH BONE. Em: INTERNATIONAL CONFERENCE MATERIALS, TRIBOLOGY, RECYCLING 2018, Vela Luka. **Anais...** Vela Luka: Croatian Society for Materials and Tribology, 2018.

BAZIN, T.; MAGNAUDEIX, A.; MAYET, R.; CARLES, P.; JULIEN, I.; DEMOURGUES, A.; GAUDON, M.; CHAMPION, E. Sintering and biocompatibility of copper-doped hydroxyapatite bioceramics. **Ceramics International**, v. 47, n. 10, p. 13644–13654, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.01.225>>

BOYD, A. R.; RUTLEDGE, L.; RANDOLPH, L. D.; MEENAN, B. J. Strontium-substituted hydroxyapatite coatings deposited via a co-deposition sputter technique. **Materials Science and Engineering C**, v. 46, p. 290–300, 2015.

BROWN, R. M.; SAXENA, I. M.; KUDLICKA, K. Cellulose Biosynthesis in higher plants. **Trends in plant science**, v. 1, 1996.

CAMARGO, M. S. A. **Avaliação da degradação de celulose bacteriana após exposição em diferentes meios abióticos e bióticos**. 2018. Dissertação - Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2018.

CARVALHO, G. C.; LOPES, J. R.; TAVARES, D. S.; ALMEIDA, L. E. Avaliação de arcabouços tridimensionais de alginato, fibroína e hidroxiapatita para regeneração tecidul óssea. Em: 9º CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIIS 2016, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu

DEMISHTAIN, K.; REIFEN, R.; SHEMESH, M. Antimicrobial properties of magnesium open opportunities to develop healthier food. **Nutrients**, v. 11, n. 10, 2019.

DIAS, A. M. **DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO IN VITRO DE CIMENTO ÓSSEO À BASE DE NANO HIDROXIAPATITAS SUBSTITUÍDAS**

COM MAGNÉSIO, ESTRÔNCIO E ZINCO. 2020. Tese - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

DONINI, Í. A. N.; DE SALVI, D. T. B.; FUKUMOTO, F. K.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Ecletica Química**, v. 35, n. 4, p. 165–178, 2010.

DU, J.; VEPACHEDU, V.; CHO, S. H.; KUMAR, M.; NIXON, B. T. Structure of the cellulose synthase complex of *Gluconacetobacter hansenii* at 23.4 Å resolution. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–24, 2016.

EHRET, C.; AID-LAUNAIS, R.; SAGARDOY, T.; SIADOUS, R.; BAREILLE, R.; REY, S.; PECHEV, S.; ETIENNE, L.; KALISKY, J.; DE MONES, E.; LETOURNEUR, D.; VILAMITJANA, J. A. Strontium-doped hydroxyapatite polysaccharide materials effect on ectopic bone formation. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, 2017.

ELGALI, I.; OMAR, O.; DAHLIN, C.; THOMSEN, P. **Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited**, Blackwell Munksgaard, 2017.

FAJSTAVROVÁ, K.; RIMPELOVÁ, S.; FAJSTAVR, D.; ŠVORČÍK, V.; SLEPIČKA, P. Cell behavior of primary fibroblasts and osteoblasts on plasma-treated fluorinated polymer coated with honeycomb polystyrene. **Materials**, v. 14, n. 4, p. 1–19, 2021.

FANG, B.; WAN, Y.-Z.; TANG, T.-T.; GAO, C.; DAI, K.-R. Proliferation and Osteoblastic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells on Hydroxyapatite/Bacterial Cellulose Nanocomposite Scaffolds. **Tissue Engineering: Part A**, v. 15, n. 5, p. 1–9, 2009.

FISCHER, M. R.; GARCIA, M. C. F.; NOGUEIRA, A. L.; PORTO, L. M.; SCHNEIDER, A. L. dos S.; PEZZIN, A. P. T. Biossíntese e caracterização de nanocelulose bacteriana para engenharia de tecidos. **Revista Matéria**, n. 3, p. 1–18, 2017.

GARCIA, M. C. F. **Bacterial nanocellulose biocomposites and hydroxyapatite with cationic substitution by Mg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} and Sr^{+2} for bone regeneration.** 2022. Tese - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

GIANNOULATOU, V.; THEODOROU, G. S.; ZORBA, T.; KONTONASAKI, E.; PAPADOPOULOU, L.; KANTIRANIS, N.; CHRISAFIS, K.; ZACHARIADIS, G.; PARASKEVOPOULOS, K. M. Magnesium calcium silicate bioactive glass doped with copper ions; synthesis and in-vitro bioactivity characterization. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 500, p. 98–109, 2018.

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

HASSAN, M.; SULAIMAN, M.; YUVARAJU, P. D.; GALIWANGO, E.; REHMAN, I. U.; AL-MARZOUQI, A. H.; KHALEEL, A.; MOHSIN, S. Biomimetic PLGA/Strontium-Zinc Nano Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Bone Regeneration. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 13, n. 1, p. 1–25, 2022.

HELENA MONTEIRO, T.; VANNUCCHI, H. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes Magnésio. **Série de Publicações ILSI Brasil**, v. 16, p. 20, 2010. Disponível em: <<https://ilsi.org/brasil/wp-content/uploads/sites/9/2016/05/16-Magnésio.pdf>>

HETRICK, E. M.; SCHOENFISCH, M. H. Reducing implant-related infections: Active release strategies. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 9, p. 780–789, 2006.

HIDALGO-ROBATTO, B. M.; LÓPEZ-ÁLVAREZ, M.; AZEVEDO, A. S.; DORADO, J.; SERRA, J.; AZEVEDO, N. F.; GONZÁLEZ, P. Pulsed laser deposition of copper and zinc doped hydroxyapatite coatings for biomedical applications. **Surface and Coatings Technology**, v. 333, p. 168–177, 2018.

HUANG, Y.; WANG, J.; YANG, F.; SHAO, Y.; ZHANG, X.; DAI, K. Modification and evaluation of micro-nano structured porous bacterial cellulose scaffold for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 75, p. 1034–1041, 2017.

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

JIN, H. H.; KIM, D. H.; KIM, T. W.; SHIN, K. K.; JUNG, J. S.; PARK, H. C.; YOON, S. Y. In vivo evaluation of porous hydroxyapatite/chitosan-alginate composite scaffolds

for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 1079–1085, 2012.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e biologia celular - Uma introdução à patologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2008.

KIM, H. L.; JUNG, G. Y.; YOON, J. H.; HAN, J. S.; PARK, Y. J.; KIM, D. G.; ZHANG, M.; KIM, D. J. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite/alginate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 54, p. 20–25, 2015.

LANGROUDI, M. M.; SARAVANI, M. G.; NOURI, A. Surfactant-assisted synthesis of polyvinylpyrrolidone-hydroxyapatite composites as a bone filler. **Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials**, v. 15, n. 4, p. e334–e340, 2017.

LEBARBENCHON, M. B. **AVALIAÇÃO DAS MEMBRANAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA E MATRIZ DÉRMICA ACELULAR (SUREDERM ®) COMO ARCABOUÇOS PARA ENGENHARIA TECIDUAL**. 2017. Dissertação - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

LEI, Y.; XU, Z.; KE, Q.; YIN, W.; CHEN, Y.; ZHANG, C.; GUO, Y. Strontium hydroxyapatite/chitosan nanohybrid scaffolds with enhanced osteoinductivity for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 72, p. 134–142, 2017.

LIU, C.; FU, X.; PAN, H.; WAN, P.; WANG, L.; TAN, L.; WANG, K.; ZHAO, Y.; YANG, K.; CHU, P. K. Biodegradable Mg-Cu alloys with enhanced osteogenesis, angiogenesis, and long-lasting antibacterial effects. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–17, 2016.

LUZ, E. P. C. G. **Desenvolvimento de materiais híbridos à base de celulose bacteriana e/ou hidroxiapatita dopados com estrôncio**. 2016. Dissertação - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

LUZ, E. P. C. G.; CHAGAS, B. S. Das; ALMEIDA, N. T. De; BORGES, M. de F.; ANDRADE, F. K.; MUNIZ, C. R.; CASTRO-SILVA, I. I.; TEIXEIRA, E. H.; POPAT, K.; ROSA, M. de F.; VIEIRA, R. S. Resorbable bacterial cellulose membranes with

strontium release for guided bone regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 116, p. 14, 2020.

MAIA, M. T.; LUZ, É. P. C. G.; ANDRADE, F. K.; ROSA, M. de F.; BORGES, M. de F.; ARCANJO, M. R. A.; VIEIRA, R. S. **Advances in Bacterial Cellulose/Strontium Apatite Composites for Bone Applications**, Taylor and Francis Ltd., 2021.

MANOOCHEHRI, H.; GHORBANI, M.; MOOSAZADEH MOGHADDAM, M.; NOURANI, M. R.; MAKVANDI, P.; SHARIFI, E. Strontium doped bioglass incorporated hydrogel-based scaffold for amplified bone tissue regeneration. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 2022.

MINATTI, T. C. da S. **Nanocompósito Celulose Bacteriana e Hidroxiapatita para Remoção de Zinco de Efluentes Industriais**. 2020. Dissertação - Universidade Federal de Santa Catarina, Joinville, 2020.

NANCI, A. **Ten Cate - Histologia Oral**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

NATH, S.; BASU, B.; SINHA, A. A Comparative Study of Conventional Sintering with Microwave Sintering of Hydroxyapatite Synthesized by Chemical Route. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs**, v. 19, n. 2, p. 93–98, 2006. Disponível em: <<http://www.sbaoi.org>>

NETO, J. da S. R. **Efeitos da substituição iônica por estrôncio na morfologia de cristais de fosfato de cálcio e no polimorfismo da hidroxiapatita hexagonal e monoclinica**. 2015. Tese - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

OFUDJE, E. A.; ADEOGUN, A. I.; IDOWU, M. A.; KAREEM, S. O. Synthesis and characterization of Zn-Doped hydroxyapatite: scaffold application, antibacterial and bioactivity studies. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p. 1–12, 2019.

PADMANABHAN, S. K.; NITTI, P.; STANCA, E.; ROCHIRA, A.; SICULELLA, L.; RAUCCI, M. G.; MADAGHIELE, M.; LICCIULLI, A.; DEMITRI, C. Mechanical and biological properties of magnesium-and silicon-substituted hydroxyapatite scaffolds. **Materials**, v. 14, n. 22, p. 1–16, 2021.

PATERNO, F. L.; SILVEIRA, M. L. L.; PEZZIN, A. P. **SCAFFOLDS DE CELULOSE BACTERIANA FUNCIONALIZADOS COM FOSFATOS METÁLICOS BIOATIVOS**. 2018. Artigo - Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2018.

PICHETH, G. F.; PIRICH, C. L.; SIERAKOWSKI, M. R.; WOEHL, M. A.; SAKAKIBARA, C. N.; DE SOUZA, C. F.; MARTIN, A. A.; DA SILVA, R.; DE FREITAS, R. A. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 97–106, 2017.

PIGOSSI, S. C. **Avaliação de compósitos à base de celulose bacteriana-hidroxiapatita com peptídeo osteogênico para reparação óssea**. 2014. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2014.

PINA, S.; CANADAS, R. F.; JIMÉNEZ, G.; PERÁN, M.; MARCHAL, J. A.; REIS, R. L.; OLIVEIRA, J. M. Biofunctional Ionic-Doped Calcium Phosphates: Silk Fibroin Composites for Bone Tissue Engineering Scaffolding. **Cells Tissues Organs**, v. 204, n. 3–4, p. 150–163, 2017.

QIU, Z. Y.; CUI, Y.; WANG, X. M. Natural bone tissue and its biomimetic. Em: **Mineralized Collagen Bone Graft Substitutes**. [s.l.] : Elsevier, 2019. p. 1–22.

RAHMAN, M. S.; RANA, M. M.; SPITZHORN, L. S.; AKHTAR, N.; HASAN, M. Z.; CHOUDHURY, N.; FEHM, T.; CZERNUSZKA, J. T.; ADJAYE, J.; ASADUZZAMAN, S. M. Fabrication of biocompatible porous scaffolds based on hydroxyapatite/collagen/chitosan composite for restoration of defected maxillofacial mandible bone. **Progress in Biomaterials**, v. 8, n. 3, p. 137–154, 2019.

RECOUVREUX. Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos. **Tese de doutorado em Engenharia Química Universidade FEderal de Santa Catarina**, v. Único, p. 145, 2008.

RETZEPI, M.; DONOS, N. Guided Bone Regeneration: Biological principle and therapeutic applications. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, n. 6, p. 567–576, 2010.

RISPOLI, L.; FONTANA, F.; BERETTA, M.; POGGIO, C. E.; MAIORANA, C. Surgery Guidelines for Barrier Membranes in Guided Bone Regeneration (GBR). **Journal of Otolaryngology and Rhinology**, p. 1–8, 2015.

RODRIGUES, B. F. F. S. **Engenharia de tecidos para regeneração da pele: retrospectiva e perspectivas futuras**. 2012. Monografia - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

SABET, A. S.; JABBARI, A. H.; SEDIGHI, M. Microstructural properties and mechanical behavior of magnesium/hydroxyapatite biocomposite under static and high cycle fatigue loading. **Journal of Composite Materials**, v. 52, n. 13, p. 1711–1722, 2018.

SANTOS, G. G.; NUNES, V. L. C.; MARINHO, S. M. O. C.; SANTOS, S. R. A.; ROSSI, A. M.; MIGUEL, F. B. Biological behavior of magnesium-substituted hydroxyapatite during bone repair. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 1, p. 53–61, 2021.

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

SCHROEDER, C. **Evaluation of bacterial nanocellulose - bioglass composites for hard tissue engineering**. 2018. Dissertação - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

SOUZA, A. L. De. **Uso de barreira de polipropileno (bone heal) - Relato de cinco casos clínicos**. 2015. Monografia - Faculdade Meridional/MED, Belo Horizonte, 2015.

TAO, Z. S.; ZHOU, W. S.; HE, X. W.; LIU, W.; BAI, B. L.; ZHOU, Q.; HUANG, Z. L.; TU, K. K.; LI, H.; SUN, T.; LV, Y. X.; CUI, W.; YANG, L. A comparative study of zinc, magnesium, strontium-incorporated hydroxyapatite-coated titanium implants for osseointegration of osteopenic rats. **Materials Science and Engineering C**, v. 62, p. 226–232, 2016.

TU, Y.; CHEN, C.; LI, Y.; HOU, Y.; HUANG, M.; ZHANG, L. Fabrication of nano-hydroxyapatite/chitosan membrane with asymmetric structure and its applications in

guided bone regeneration. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 28, n. 3, p. 223–233, 2017.

VANNUCHI, H.; MONTEIRO, T. H. **Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes - Magnésio**. São Paulo. v. 16

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

WAN, Y.; ZUO, G.; YU, F.; HUANG, Y.; REN, K.; LUO, H. Preparation and mineralization of three-dimensional carbon nanofibers from bacterial cellulose as potential scaffolds for bone tissue engineering. **Surface and Coatings Technology**, v. 205, n. 8–9, p. 2938–2946, 2011.

WANG, Q.; TANG, P.; GE, X.; LI, P.; LV, C.; WANG, M.; WANG, K.; FANG, L.; LU, X. Experimental and simulation studies of strontium/zinc-codoped hydroxyapatite porous scaffolds with excellent osteoinductivity and antibacterial activity. **Applied Surface Science**, v. 462, p. 118–126, 2018.

WEI, S.; MA, J. X.; XU, L.; GU, X. S.; MA, X. L. **Biodegradable materials for bone defect repair**, BioMed Central Ltd, 2020.

WU, X.; WALSH, K.; HOFF, B. L.; CAMCI-UNAL, G. **Mineralization of biomaterials for bone tissue engineering**, MDPI AG, 2020.

XU, T.; HE, X.; CHEN, Z.; HE, L.; LU, M.; GE, J.; WENG, J.; MU, Y.; DUAN, K. Effect of magnesium particle fraction on osteoinduction of hydroxyapatite sphere-based scaffold. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 37, p. 5648–5660, 2019.

YAMADA, Y.; YUKPHAN, P.; LAN VU, H. T.; MURAMATSU, Y.; OCHAIKUL, D.; TANASUPAWAT, S.; NAKAGAWA, Y. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 397–404, 2012.

ZHANG, S.; XIONG, G.; HE, F.; HUANG, Y.; WANG, Y.; WAN Y. Characterisation of Hydroxyapatite/Bacterial Cellulose Nanocomposites. **Polymers & Polymer Composites**, v. 17, n. 6, p. 6, 2009.

ZOU, L.; ZHANG, Y.; LIU, X.; CHEN, J.; ZHANG, Q. Biomimetic mineralization on natural and synthetic polymers to prepare hybrid scaffolds for bone tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178, p. 222–229, 2019.

