



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCOMPÓSITO DE
BIOPOLÍMERO PRODUZIDO PELA ZOOGLOEA sp.

CATARINE BEZERRA CAVALCANTI

RECIFE, 2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCOMPÓSITO DE
BIOPOLÍMERO PRODUZIDO PELA ZOOGLOEA sp.**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do grau de mestre na área de concentração em Produção e Controle de Medicamentos.

**Mestranda: CATARINE BEZERRA CAVALCANTI
Orientadora: Prof.^a Dr.^a NEREIDE STELA DOS SANTOS MAGALHÃES
Co-orientador: Prof. Dr. JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR**

RECIFE, 2009

Cavalcanti, Catarine Bezerra

Desenvolvimento e caracterização de biocompósito de biopolímero produzido pela Zoogloea sp. / Catarine Bezerra Cavalcanti. – Recife : O Autor, 2009.

61 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2008.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Bioquímica. 2. Biocompósito. 3. Biopolímero. 4 . Zoogloea sp. 5 . Hidroxiapatita. I. Título.

577.12
574.192 14

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2009-148



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Recife, 27 de fevereiro de 2009.

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 27 de fevereiro de 2009 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Nereide Stela Santos Magalhães

(Deptº de Bioquímica e Biofísica da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: Nereide Stela Santos Magalhães

EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Beate Saegesser Santos

(Deptº Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: Beate Saegesser Santos

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Maria da Paz Carvalho da Silva

(Deptº de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: Maria da Paz Carvalho da Silva

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REITOR

Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Thadeu Pinheiro

VICE- DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Dalci José Brondani

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Antônio Rodolfo de Faria

COORDENADOR DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Pedro José Rolim Neto

**VICE-COORDENADOR DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Beate Seagesser Santos

Dedico este trabalho aos meus pais, Murilo e Lenita, pelo amor e pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido a vida, a proteção, a força e a vontade de crescer profissionalmente, pessoalmente e espiritualmente.

À minha família, Murilo pai, Lenita, Karine e Murilo filho, pelo amor, pelo incentivo em todos os momentos, e que, embora distantes, me confortaram e me apoiaram a sua maneira.

À minha segunda família, Seu Paulo, Dona Irene, Ana, Paulinho e Marco, pelo apoio e pela forma com que sempre me receberam desde quando nos conhecemos.

À minha orientadora, minha eterna professora querida, Prof^a Nereide Stela Santos Magalhães, por ter me aceitado no grupo, pela orientação, pela confiança e pela amizade. Ao meu co-orientador, José Lamartine de Andrade Aguiar, pela seriedade, pelo apoio e pela amizade durante a realização deste trabalho.

Aos professores da Pós-Graduação, Pedro Rolim, Beate Santos, Haroudo Sátiro, Ivone Souza, Elba Cavalcanti, Rodolfo Farias e Nelly Caetano, pela amizade, pelo conhecimento e pelas dúvidas tiradas nos corredores.

Aos amigos de trabalho do SLC, Waldenice Alencar, Fabiana Tolêdo, Mariane Cajubá, Milena Ferraz, Elisângela Mendonça, Islene, Rafaela Ferraz, Fábio Fidlis Isabela, Hywre, Taciana e demais componentes do SLC, pela convivência, pela união e pela amizade. Sem esquecer dos mascotes do SLC, Gabriel e Letícia.

Às minhas alunas de iniciação científica Elisângela Silva e Débora Máximo, pelo trabalho realizado em conjunto, pela amizade e pelo apoio.

Aos amigos da Pós-Graduação, Magaly, Clayton, Adley, Mirtes, Talita, Ivana e André Luís, pela amizade que se firmou ainda mais neste período.

A meus amigos Leonardo, Karollina, Filipe, Natália, Roseana, Milton, Flávia, Marcos, Érika, Ana Karla, José de Arimateia da Rocha Filho, Flávia, Kátia e Maria da Conceição pelo apoio em todos os momentos.

A meus amigos do Rio, Agostinho David, Edna, Bárbara, João Ramalho e Ilana Santiago pela torcida.

A todos do Laboratório de Imunologia Keizo-Asami (LIKA), em especial os do laboratório de Bioquímica, por toda ajuda e amizade.

A todos os funcionários do LIKA pelo apoio técnico, em especial Rafael, Sérgio, Seu Otaviano e Vera.

À Coordenação de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial às secretárias Conceição e Margarete, pela ajuda burocrática.

À Coordenação de Pós-Graduação em Cirurgia, pela concessão da bolsa de estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior-CAPES, pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

"Existir é poder refinar nossa consciência de que somos preciosos demais para nos desperdiçarmos buscando ser quem não somos, não podemos, nem queremos ser."

Lya Luft

SUMÁRIO

	PÁGINAS
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Biomateriais	17
2.2 Hidroxiapatita	20
2.3 Celulose	21
2.3.1 Celulose e seu uso como biomateriais	22
2.4 Celulose Bacteriana	24
2.5 <i>Zoogloea</i> sp	26
2.5.1 Biopolímero produzido pela <i>Zoogloea</i> sp	27
2.5.2 Aplicações Biomédicas da membrana de Biopolímero	29
2.5.3 Gel de Biopolímero	30
3.OBJETIVOS	32
3.1 Objetivos Gerais	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4 METODOLOGIA	33
4.1 ARTIGO	34
5 CONCLUSÕES	51
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
7 ANEXOS	61

ABREVIATURAS E SIGLAS

AGU	Unidade de anidrogucose
AU	Ácido úsnico
BC	Celulose bacteriana
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
CH ₂ (OH) ₃ CNH ₂	tris(hidroximetil) aminometano
DSC	Calorimetria diferencial exploratória
DTA	Derivada termogravimétrica
DRX	Difração de raios-X
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier
GBP	Gel de biopolímero
HA	Hidroxiapatita
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
K ₃ HPO ₄ .3(H ₂ O)	Fosfato de potássio monobásico
MBP	Membrana de biopolímero
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MgCl ₂ .6H ₂ O	Cloreto de magnésio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
OH	Hidroxila
PTFE-e	Politrifluoretileno expandido

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** Estrutura molecular da celulose com suas unidades de anidroglicose (AGU). 22
- Figura 2** Mecanismos de obtenção da celulose. 24
- Figura 3** Mecanismo de ativação da celulose bacteriana para formação de hidroxiapatita. 26
- Figura 4.** Aspecto morfológico da membrana de biopolímero produzido por via microbiológica, através da bactéria *Zoogloea sp.* em mosto de melão de cana-de-açúcar com diferentes dimensões 27
- Figura 5.** Biogel obtido através da membrana de biopolímero produzido pela *zoogloea sp.* 31

ARTIGO

- Figura 1.** Micrografias MEV de amostras de biocompósito (a,c,e,g) e do bicompósito ativado com Ca(OH)_2 (b,d,f,h) durante imersão em solução SBF por 28 dias para avaliação de depósito de hidroxiapatita: (a,b) antes da imersão; (c,d) 7 dias (e,f) 14 dias e (g,h) 28 dias após a imersão 43
- Figura 2.** Microanálise utilizando MEV associada à espectroscopia de energia dispersiva da nucleação de hidroxiapatita em biocompósito sem ativação (a-d) e biocompósito ativado com Ca(OH)_2 (e-h) durante imersão em solução SBF por 28 dias: (a,b) e (e,f) 14 dias e (c,d) e (g,h) 28 dias após a imersão, respectivamente 45

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

PÁGINAS

Tabela 1. Composição de monossacarídeos das frações solúveis produzidas por hidrólise com ácido trifluoracético sob condições moderadas e fortes, determinadas através de CLAE.

28

ARTIGO

PÁGINAS

Tabela 1. Composição, pureza e quantidade de eletrólitos necessária para obtenção de 1 litro de solução SBF. (ISO 23317,2005).

40

RESUMO

Um exopolissacarídeo produzido pelo microorganismo **Zoogloea sp.**, obtido por fermentação do melaço de cana-de-açúcar representa um material promissor para usos biomédicos e farmacêuticos com baixa toxicidade e biocompatibilidade estabelecidas. O presente trabalho consiste em utilizar o biopolímero da cana-de-açúcar no desenvolvimento de biocompósito para reparo ósseo com e sem ativação por hidróxido de cálcio e avaliar a nucleação e deposição de hidroxiapatita no biocompósito, utilizando solução simuladora do fluido corpóreo. O processo de nucleação e deposição de hidroxiapatita (HA) foi comprovado pela técnica de microscopia eletrônica de varredura acoplada a espectroscopia de energia dispersiva (MEV-EDS). A análise morfológica dos biocompósitos com e sem ativação demonstraram a deposição de hidroxiapatita em velocidade e morfologia diferentes em função da ativação prévia do biocompósito. A microanálise por EDS comprovou qualitativamente a deposição de hidroxiapatita através da identificação dos elementos químicos e íons responsáveis pela nucleação, demonstrando que o processo de ativação do biocompósito com Ca(OH)_2 acelera a deposição de hidroxiapatita. Os resultados preliminares indicam a utilização do biocompósito como implante ósseo e ou em engenharia de tecidos ósseos.

.

Palavras-Chaves: Biocompósito, Biopolímero, **Zoogloea sp.**, Nucleação, Hidroxiapatita.

.

ABSTRACT

Exopolysaccharide produced by a microorganism **Zoogloea sp.** obtained from fermentation of molasses sugarcane is a promising material for biomedical and pharmaceutical uses with low toxicity and biocompatibility established. The present work is comprise the biopolymer of sugar cane in the development of biocomposite for bone repair with and without activation by calcium hydroxide and to evaluate the nucleation and deposition of hydroxyapatite in biocomposite, using the solution simulating body fluid. The process of hydroxyapatite (HA) nucleation and deposition was demonstrated by the technique of scanning electron microscopy coupled to energy dispersive spectroscopy (SEM-EDS). Morphological analysis of biocomposites with and without activation showed the deposition of hydroxyapatite in different speed and morphology according to the prior activation of biocomposite. The microanalysis EDS showed qualitatively by the deposition of hydroxyapatite through the identification of chemical elements and ions responsible for nucleation, showing that the activation process of biocomposite with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ accelerates the deposition of HA. Preliminary results suggest use of biocomposite as bone implant or tissue engineered bone.

Keywords: Biocomposite, Biopolymer, **Zoogloea sp.**, Nucleation, Hydroxyapatite

1. INTRODUÇÃO

A inquietação do homem em restaurar ou substituir partes danificadas do tecido ósseo é uma prática que remonta à antiguidade, como comprovado em vários achados arqueológicos. Apesar desses registros históricos, só após o advento do conhecimento científico e do desenvolvimento de biomateriais é que esse procedimento se tornou uma prática confiável (RATNER, 2004; RESENDE, 2007). Os biomateriais necessitam de integração aos tecidos e apresentam características físicas adequadas a sua função. Entretanto, alguns materiais artificiais implantados no osso tendem a ser encapsulados com tecidos fibrosos, que os isolam do contato direto com a matriz óssea. Conseqüentemente, eles não aderem ao osso devido à ausência de ligação química na interface material/tecido ósseo (KOKUBO, 2004).

A celulose se constitui na mais importante e renovável matéria orgânica da terra e atrai atenção devido as suas propriedades físico-químicas e é utilizada para diversas aplicações (CHEN et al; 2006; GU et al, 2007). A obtenção de celulose pode ser feita por diversas fontes, como vegetais, bactérias e algas. Pela facilidade de obtenção e pela conservação de suas propriedades físico-químicas, a celulose tem sido obtida por fermentação de bactérias, sendo denominada de celulose bacteriana (CB) (MATSUMOTO et al, 2003; FROLLINI et al, 2005). A celulose bacteriana possui uma nanoestrutura fibrilar única, que determina propriedades físicas e mecânicas características, que lhe conferem papel bastante promissor na medicina moderna e nas pesquisas biomédicas (CZAJA et al., 2007).

Diferentes fontes de carbono podem ser utilizadas para a produção de celulose, e pesquisas de novas fontes têm sido desenvolvidas para alternativas de substratos de baixo custo com redução de danos ambientais (GOELZER et al, 2008). O uso de melão de beterraba, cana-de-açúcar e casca de arroz tem sido a fonte utilizada como meios fermentativos para produção de celulose e outros biopolímeros (BERWANGER, 2005).

Um exopolissacarídeo produzido pelo microorganismo *Zoogloea sp.* utilizado como meio fermentativo, o melão de cana-de-açúcar, foi obtido como uma membrana fibrosa branca translúcida. Esse biopolímero “in natura” foi caracterizado utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência, que apresenta o seguinte perfil monossacarídico: glicose (87,6%), xilose (8,6%), manose (0,8%), ribose (1,7%), galactose (0,1%), arabinose

(0,4 %), e ácido glucurônico (0,8%). Devido à presença de resíduos (1 → 4)-β-D-glucopiranosil corroborada pela hidrólise enzimática com celulase, o biopolímero pode ser considerado como um exopolissacarídeo celulósico (PATERSON-BEEDLE et al., 2000; CASTRO et al., 2004; CAVALCANTE et al., 2006, NETO, 2008).

Estudos de citotoxicidade da membrana de biopolímero (MBP) avaliada por meio de índice de adesão, produção de óxido nítrico e viabilidade celular de macrófagos alveolares de ratos, revelaram biocompatibilidade desse material (CASTRO et al, 2004). Frente a esse estudo, diversos ensaios experimentais em animais têm sido realizados utilizando a Membrana de Biopolímero como remendo em arterioplastias femorais e enxerto de membrana de tímpanos, miringoplastia (AGUIAR et al, 2007 e DA SILVA, 2006). As membranas contínuas e perfuradas foram utilizadas como reforço no tratamento de defeitos críticos da parede abdominal resultando na biointegração e resistência provas a biomecânicas (NETO ET al, 2008, FALCÃO et al, 2008).

A partir da Membrana de biopolímero, foi desenvolvido um gel (AGUIAR et al, 2003), que apresenta biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*. O referido gel foi aplicado para confecção de válvula vesicouretral com vistas ao tratamento de refluxo vesico-uretral (RANGEL et al, 2006). Outra linha de aplicação do gel consiste no desenvolvimento de formas farmacêuticas com a incorporação de fármacos para diversas aplicações. A metodologia de obtenção do gel de biopolímero com ácido úsnico (AU) foi desenvolvida e caracterizada por análise térmica e microscopia por força atômica (AFM), demonstrando que a adição do AU melhorou as propriedades térmicas do gel (NÉRIS, 2007).

Com base nos trabalhos realizados dos trabalhos realizados com o biopolímero em diversas aplicações em animais, o objetivo deste trabalho consiste na avaliação da hidroxiapatita utilizando-se a solução simuladora do fluido corpóreo com vistas ao desenvolvimento de um biocompósito para fins de reparos ósseos.

2-REVISÃO DA LITERATURA

2.1-Biomateriais

Segundo a Conferência de Consenso em Biomateriais para Aplicações Clínicas realizada em 1982, os biomateriais são definidos como toda substância (com exceção de drogas ou fármacos) ou combinação de substâncias de origens naturais ou sintéticas, que, durante um período de tempo indeterminado, são empregados como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais. Assim, é um material não-tóxico, usado como aparelho médico, caracterizado por interagir com sistemas biológicos (RESENDE, 2007, WILLIAMS, 1987). Para um material ser enquadrado na categoria de biomateriais, ele deve apresentar algumas características como: ser biocompatível com o organismo vivo de forma a provocar a mínima reação adversa ao organismo; além disso, o material deve ser biofuncional, ou seja, deve ser capaz de exercer a função que lhe é incumbida como se fosse próprio do organismo (RESENDE, 2007), tendo como principais vantagens em implantes, próteses ou dispositivos implantáveis, sua disponibilidade, reprodutibilidade e adaptação biomecânica (LEAL 2006).

Os biomateriais utilizados clinicamente induzem diferentes respostas nos tecidos e, em função do tipo de interface tecido/implante desenvolvida, podem ser classificados em:

Bioinertes

São materiais tolerados pelo organismo e que praticamente não liberam nenhum tipo de componente. No entanto, esses materiais tendem a ser envolvidos por uma cápsula fibrosa que o isolam do meio vivo. A espessura da camada fibrosa depende de muitos fatores, como condições do implante, tecido e carga mecânica existente na interface (RESENDE, 2007, CASTNER e RATNER, 2002; HENCH e WILSON, 1993).

Bioativos

São materiais que favorecem a ligação química entre o material implantado e o tecido ósseo (osteointegração), sem a presença de invólucros fibrosos. Em função da similaridade química entre tais materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução por meio de recobrimento por células ósseas. Quando o material bioativo é implantado no corpo, uma série de reações bioquímicas e biofísicas ocorre na interface implante/tecido. Essas reações eventualmente resultam em uma ligação interfacial de natureza química e não-física (RESENDE, 2007, HENCH e WILSON, 1993). Os materiais bioativos podem ainda ser classificados em:

Materiais osteoindutores - são os que promovem uma resposta intracelular e extracelular na interface. Como exemplo pode citar as vitrocerâmicas que pode ligar-se com tecido macio e também com o osso.

Materiais osteocondutores - são os que promovem uma superfície biocompatível que favorece o desenvolvimento das células ósseas. Isso ocorre quando um material promove somente uma resposta extracelular na interface. Como exemplo a hidroxiapatita sintética e os fosfatos de cálcio (RESENDE, 2007; CAO e HENCH, 1996).

Reabsorvíveis

Implantes reabsorvíveis são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo após certo período de contato com o tecido. Esses materiais são muito importantes em aplicações clínicas em função de serem desnecessárias novas intervenções cirúrgicas para a retirada do material implantado. São exemplos desses materiais os fosfatos tricálcio (RESENDE, 2007, HENCH e WILSON, 1993).

Segundo Shirliff e Hench (2003), a classificação de biomateriais em bioinertes ocorreu na primeira geração de biomateriais, cuja meta principal era conseguir uma

combinação das propriedades que fossem próximas às do tecido que seria substituído, de forma a provocar a mínima reação tóxica possível. Já os materiais reabsorvíveis e bioativos pertencem à segunda geração de biomateriais. Desde então, vários materiais foram enquadrados em uma dessas categorias, o que promoveu avanço na produção de dispositivos para aplicações biomédicas, e conseqüentemente melhora na qualidade de vida dos pacientes. Apesar desse avanço, observou-se que tais materiais possuíam vida curta e falhavam em torno de 10-25 anos depois de implantados, o que levava o paciente a outra intervenção cirúrgica. Ainda assim, eles não respondem a uma mudança fisiológica ou estímulo bioquímico, ao contrário do tecido vivo. Devido a essas limitações, surgiu recentemente a terceira geração de biomateriais, que tem como foco principal melhorar a capacidade de regeneração do tecido pela estimulação de genes, os quais iniciam o reparo do tecido danificado ou doente (RESENDE, 2007).

Biomateriais para reparo ósseo precisam apresentar propriedades mecânicas similares ao osso e dar suporte à regeneração óssea. Além disso, devem possibilitar adesão, proliferação e diferenciação celular (TAKAMORI, 2004, SEAL et al, 2001). A reconstrução óssea ideal depende, principalmente, do número e da atividade de células osteoprogenitoras (TAKAMORI, 2004, OREFFO e TRIFFIT, 1999).

Dentre os materiais sintéticos usados para biorreparação do tecido ósseo, as cerâmicas, também conhecidas como biocerâmicas, são as mais empregadas. As biocerâmicas apresentam-se sob a forma de pós, revestimentos ou próteses usadas para reparo, aumento ou substituição de tecidos doentes ou danificados, como ossos, articulações e dentes. Embora muitas composições de cerâmicas tenham sido testadas para uso médico, poucas são usadas clinicamente. Destas, podem-se citar as Al_2O_3 e ZrO_2 , usadas, inicialmente, na substituição total de articulações dos quadris e fêmur; os fosfatos de cálcio, usados como revestimento de ligas metálicas e em formato de granulados ou de pequenas peças porosas para reparo ósseo; os vidros e vitrocerâmicas bioativos, usados para substituição e reparo de ossículos do ouvido interno, dentes e vértebras (DOMINGUES et al, 2006, CAO et al, 1996, HENCH et al, 1993).

Titânio e suas ligas têm sido muito utilizados para produzir componentes biomédicos, principalmente na área odontológica e ortopédica, pois exibem algumas propriedades interessantes como resistência à tenacidade, biocompatibilidade, resistência à

corrosão, estabilidade química em ambiente fisiológico e módulo de elasticidade mais próximo ao do osso, se comparado com o aço inoxidável ou com a liga de Co-Cr-Mo (RESENDE, 2007).

Os polímeros sintéticos permitem melhor controle dos riscos biológicos e de suas propriedades físico-químicas, entretanto, a maioria induz resposta imune/inflamatória após sua implantação, o que promove o desenvolvimento de compósito polímero-cerâmica produzido naturalmente por organismos conhecidos, como a celulose e a quitosana, ácido hialurônico e polímeros biodegradáveis, como a ϵ -caprolactona e polímeros do ácido lático e glicólico, por apresentarem propriedades biocompatíveis e atóxicas quando comparados com os produzidos sinteticamente (YANG et al, 2008, TAKAMORI, 2004, WILLIAMS, 2000, BEPPU, 1999).

2.2. Hidroxiapatitas

As apatitas biológicas são aquelas constituintes de compostos que formam parte do esmalte e da dentina dos dentes assim como dos ossos humanos e de algumas calcificações patológicas (cálculos dentais, salivares e renais). Com fórmula molecular, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, a hidroxiapatita (HA) é um dos materiais utilizados pelos vertebrados para compor o esqueleto, devido à sua capacidade de atuar como reserva de cálcio e fósforo. Além disso, a (HA) biológica acomoda facilmente uma grande variedade de substituições catiônicas e aniônicas em sua estrutura, com a presença de íons diversos, tais como: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , CO_3^{2-} (RESENDE, 2007). Essas apatitas biológicas diferem da HA puro em estequiometria, composição, cristalinidade e outras propriedades físicas e mecânicas, e presença de composições iônicas em sua estrutura (LEAL, 2006; RESENDE, 2007).

Além de ser considerada a fase mais estável em ambiente fisiológico, sendo, portanto, o componente principal do mineral ósseo, a HA possui propriedades de biocompatibilidade e bioatividade. Dessa forma, é capaz de favorecer o crescimento ósseo nos locais em que se encontra (osteocondutividade), estabelecer ligações de natureza química entre ela e o tecido ósseo (bioatividade), permitindo assim a proliferação das células ósseas (osteoblastos, fibroblastos e outras), as quais não a distinguem da superfície

óssea, o que indica a grande similaridade química superficial. Contudo, a baixa resistência mecânica dessas cerâmicas tem limitado suas aplicações como implantes (JARCHO, 1992). A hidroxiapatita livre de impurezas, para fins de materiais de implantes, já vem sendo testada desde 1940 (MENDES FILHO, 2006), podendo ser utilizada nas formas porosa, sólida, ou como material de recobrimento em substrato de titânio e suas ligas, aços inoxidáveis e compósitos. De um modo geral, a hidroxiapatita apresenta as vantagens de ser bioativa e osteocondutora, possui alta resistência à corrosão e de compressão e é utilizada em implantes como peças sólidas e porosas. Como muitas cerâmicas, apresentam como desvantagem baixa ductilidade e alta densidade relativa (MENDES FILHO, 2008; PARK, 1990).

Em implantes ósseos cuja composição consiste de outros materiais, um dos pré-requisitos para um material ligar-se ao osso é a formação de uma camada de apatita biologicamente ativa na interface material/osso, usualmente conhecido como “**bone-like apatite**” (KOKUBO et al, 2000). Tal camada de apatita é similar à fase mineralizada do tecido ósseo, em composição e estrutura. Acredita-se que ela atua como sinalizadora de proteínas e células para iniciar a cascata de eventos que resulta na formação da estrutura óssea. Ou seja, os osteoblastos, células ósseas responsáveis pela produção do tecido ósseo, proliferam preferencialmente e se diferenciam, produzindo apatita e colágeno sobre a camada de apatita formada anteriormente, o que favorece a união do implante com o osso. Quando isso ocorre, uma ligação química é formada entre o osso e a camada de apatita, reduzindo a energia interfacial entre elas (KOKUBO et al, 2003).

.

2.3. Celulose.

A celulose constitui-se no polissacarídeo mais abundante da biosfera, representando cerca de $1,5 \times 10^{12}$ toneladas da produção total anual de biomassa, e é considerada uma fonte de matéria-prima quase inesgotável para o aumento da demanda por produtos ambientalmente corretos e biocompatíveis (KLEMM et al, 2005 apud GURGEL, 2007). É um poliosídeo de glicose não-ramificado unido de ligações β -1,4 (STRYER et al, 2004). A cadeia, extensa e retilínea, é formada e suas ligações glicosídicas do tipo β , com grande número de grupos hidroxila, três por unidade de anidroglicose (AGU), presente na

conformação termodinamicamente preferida 4C_1 . O comprimento da cadeia de celulose é expresso em número de constituintes de AGUs (grau de polimerização, GP) e varia com a origem e o tratamento da matéria-prima. A cadeia de celulose consiste em uma terminação de uma unidade de D-glucose com um grupo C4-OH original (terminação não redutora); e outra terminação é finalizada com um grupo C1-OH original, que está em equilíbrio com a estrutura de aldeídos demonstrados na figura 1 (KLEMM et al, 2005 apud GURGEL 2007).

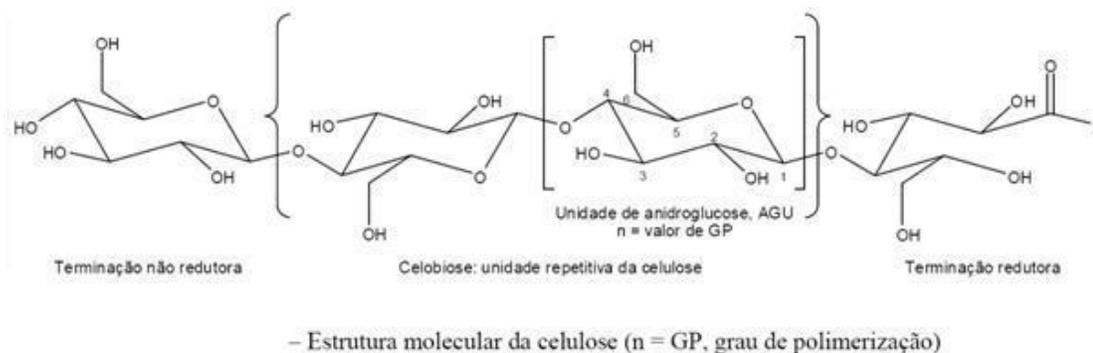


Figura 1. Estrutura molecular da celulose com suas unidades de anidroglicose (AGU) (GURGEL, 2007).

A estrutura molecular confere à celulose algumas propriedades: hidrofiliabilidade, quiralidade, degradabilidade e ampla variabilidade química iniciada pela alta reatividade de seus grupos hidroxilas (OH). Além disso, são excelentes formadoras de fibras, gerando uma força tênsil, formando complexos inter e intra-moleculares de pontes de hidrogênio. Essa conformação, além de fornecer parcial cristalinidade e polimorfismo, faz com que esse polissacarídeo seja de baixa ou quase nenhuma solubilidade nos solventes convencionais (GU et al, 2006, KLEMM et al, 2005 apud GURGEL 2007).

2.3.1. Celulose e seu uso como biomateriais e substituto de osso.

Segundo Philipp e colaboradores (1979), e Martson e colaboradores (1998), a biocompatibilidade da celulose e seus derivados está bem estabelecida (MÜLLER et al, 2006). Entretanto, as propriedades físico-químicas características devido a seu arranjo molecular, incluindo sua insolubilidade, grau de polimerização e cristalinidade limitam seu

uso para diversos campos. Sendo assim, os derivados da celulose, como carboximetilcelulose, acetato de celulose, celulose oxidada e outros derivados de celulose, constituem o foco de pesquisa em diversas áreas, como as farmacêuticas, alimentícias (FRICAIN et al, 2002) e adjuvantes farmacêuticos e na indústria de alimentos (PETROVICK, 1997).

O desenvolvimento de materiais para diversas funções, como membranas (por exemplo, diálise, biosensores), géis bioadesivos de celulose, como dispositivos vasculares, engenharia de tecidos, como ósseo, cartilagem, tecidos cerebrais e tecido conjuntivo, como sistema de administração de medicamentos e como suporte funcional *in vitro* de células cardíaca (MÜLLER et al, 2006).

No entanto, no caso da engenharia de tecidos e próteses ósseas, o vínculo osso e celulose, não é completamente observada a osteointegração. Para que isso ocorra, faz-se necessária uma fosforilação química da celulose em solução de fosfato de Cálcio (PAC) e a nucleação de fosfato induzida por cloreto de cálcio (CaCl_2), presente em solução biomimética, ou solução simuladora do fluido corpóreo (SBF) (MÜLLER et al 2006, FRICAIN,2002).

Uma propriedade da celulose como **scallfold**, e engenharia de tecidos ósseos, além de mecânica e compatibilidade biológica, é sua integração com o tecido circundante. Uma estratégia interfacial para a superfície é fixação com revestimento de celulose bioativo, a hidroxiapatita. A camada interfacial, que é formado após implante de materiais bioativos, é composta por hidroxiapatitas carbonatadas (HCA). Inúmeras técnicas foram desenvolvidas para a formação de apatita sobre a celulose. Métodos envolvem a criação de superfície de grupos funcionais, como o grupo carboxila (COO^-), que foram relatados para serem mais eficazes na nucleação de fosfato de cálcio devido a sua maior carga negativa (HOFMANN, et al, 2006,).

2.4. Celulose bacteriana

Para a obtenção da celulose até o presente momento, existem quatro rotas diferentes. A primeira delas consiste no isolamento industrial de celulose a partir de plantas, incluindo processos de separação para remoção de lignina e hemiceluloses. A segunda forma consiste na biossíntese de celulose por diferentes tipos de microorganismos, como Algae (*Vallonia*), fungi (*Saprolegmia*, *Dictyostelium discoideum*) ou bactérias (*Acetobacter*, *Achromater*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Alcaligenes*, *Zoogloea*). Entretanto, nem todas as espécies citadas são capazes de produzi-las e secretá-las como fibra extracelular. A terceira via consiste em reações enzimáticas utilizando flúor celobiose, e a quarta, em semissíntese da glicose pelo anel de abertura e de polimerização, utilizando derivados benzilados. A figura 2 exibe o mecanismo de obtenção de celulose pelos mecanismos expostos (KLEMM et al, 2001).

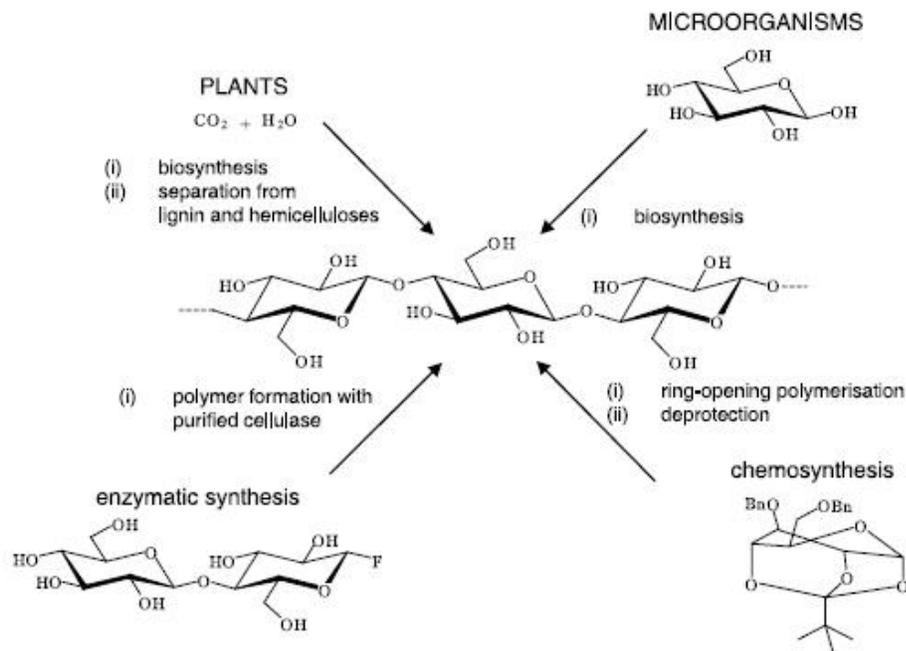


Figura 2. Mecanismos de obtenção de celulose (KLEMM et al, 2001, KIRSHENBAUM et al, 1999).

A celulose bacteriana (CB) mais reportada é a produzida pelas bactérias do gênero *Acetobacter xylinum*. Elas produzem um tipo de celulose considerada quimicamente pura

porque não contém resíduos de lignina e outras impurezas que normalmente ocorrem na celulose de origem vegetal (KLEMM et al, 2001). Essa bactéria constrói uma película de celulose bacteriana, entre o meio de cultura e a superfície gasosa, que tem, em um lado, uma superfície densa, e uma camada gelatinosa do lado oposto, que está em contato com o líquido (PÉRTILE, 2007). Suas características físico-químicas, como a alta cristalinidade (celulose I α), os altos graus de polimerização, hidrofobicidade, tensão e cristalinidade a distinguem de outras formas de celulose e variam conforme a origem e o modo do tratamento químico de suas membranas (GEORGE et al, 2005).

Na área biomédica, tem despertado um grande interesse em pesquisa, obtendo bons resultados como produção de pele artificial, prótese de diafragma acústico, biomateriais ortopédicos, suporte para culturas celulares (**scaffolds**) e vasos sanguíneos artificiais para cirurgia (SVENSSON et al., 2005; FRICAIN et al, 2002; KLEMM et al, 2001; PATTERSON-BEEDLE et al, 1999; YAMANAKA & WATANABE, 1994).

Para interações tecido – celulose de origem vegetal, caso semelhante ocorre com a celulose bacteriana, onde a interação é dificultada devido às suas propriedades físico-químicas. Para o desenvolvimento de produtos para reparos ósseos, utilizando a celulose bacteriana como matéria prima, o procedimento se dá através de ativação da membrana. Nesse caso, a ativação da CB por adição de CaCl₂ e fosforilação realizada por Wan e colaboradores (2006) demonstrou que esse processo aumenta a expectativa da celulose bacteriana devido a seu desempenho mecânico e integração tecidual. Os grupos funcionais interagem com as hidroxilas terminais do carboidrato, e com isso aumenta o processo de formação e deposição de hidroxiapatita. A figura 2 consiste no mecanismo de ativação da CB para a formação de hidroxiapatita em solução biomimética SBF.

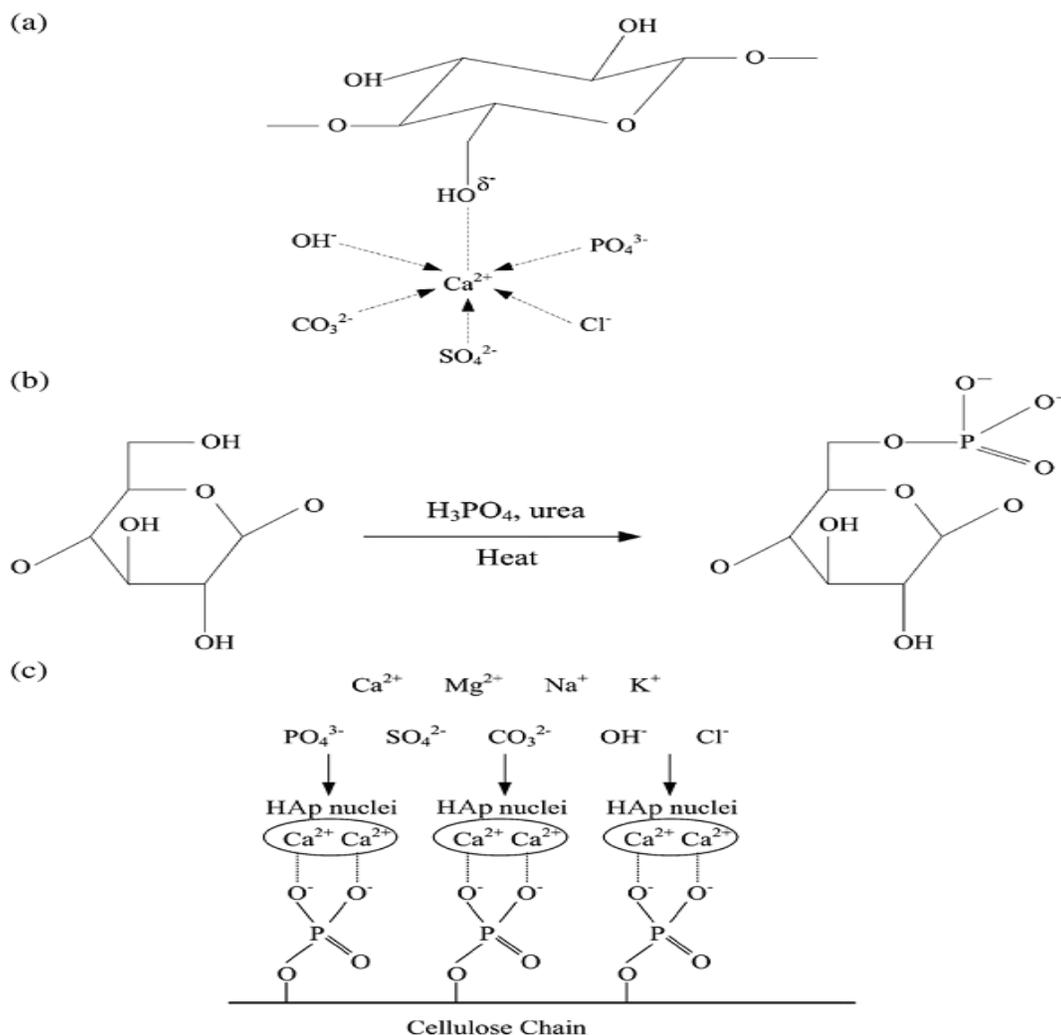


Figura 3. Mecanismo de ativação da celulose bacteriana para formação de hidroxiapatita. (WAN et al, 2006).

2.5 - Zoogloea sp.

A *Zoogloea ramigera* 115, uma bactéria Gram-negativa, produz um exopolissacarídeo denominado de “zooglan”, demonstrando forte afinidade por íons metálicos e aminoácidos, sendo utilizada como despoluente de ambientes aquáticos com alto teor de matéria orgânica. Investigações estruturais desse biopolímero estabeleceram que o **zooglan** consiste num exopolissacarídeo altamente ramificado composto de D-

glicose, Dgalactose e ácido pirúvico em proporções de 11:3:1,5 respectivamente (TROYANO et al., 1996; PATERSON-BEEDLE et al., 2000).

Em 1996, Troyano e colaboradores isolaram uma cepa mutante, a **Z. ramigera** 115SL. Essa cepa produz exopolissacarídeo não-vinculado à parede celular, mas sim liberado no próprio meio de cultura, sendo necessário o isolamento do polissacarídeo por precipitação. A composição de monômeros de açúcares é a mesma, diferindo apenas na relação de glicose: galactose e maior teor de piruvato e acetato por subunidade e duas ramificações resíduos, que indicam uma estrutura mais irregular.

Kong e colaboradores. (1998 e 2002) descrevem, em estudos prévios, uma linhagem bacteriana, identificada como **Zoogloea sp.** (KCCM10036), isolada do ambiente marinho, que produziu dois polissacarídeos extracelulares distintos: um polissacarídeo solúvel em água e um polissacarídeo fixo à superfície da célula. Ambos os polissacarídeos continham os açúcares glicose, galactose e manose como componentes, mas com as relações molares diferentes. Ambos os polissacarídeos apresentaram comportamento fluido não-Newtoniano, pseudoplástico, sendo avaliado o comportamento reológico das soluções desses polissacarídeos frente a uma gama extensiva de pH (2-12) e temperatura (20-80°C), como a compatibilidade com Cloreto de sódio (NaCl).

2.5.1- Biopolímero produzido pela Zoogloea Sp.

Na estação experimental da cana-de-açúcar, o biopolímero foi obtido por fermentação do melaço da cana-de-açúcar utilizando a bactéria **Zoogloea sp.**, identificada e isolada no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (FALCÃO et al, 2008, NÉRIS, 2007, Cavalcante et al., 2006, Paterson-beedle et al ,2000).

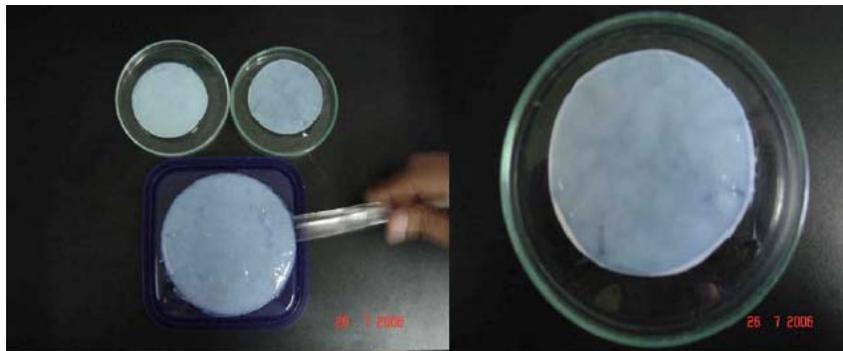


Figura 4. Aspecto morfológico da membrana de biopolímero produzido por via microbiológica, através da bactéria *Zoogloea sp.* em mosto de melação de cana-de-açúcar com diferentes dimensões (NÉRIS, 2007)

Como matéria prima foi utilizada o melação de cana-de-açúcar padronizado em Brix15%, pH-5,0 esterilizado em autoclave. As culturas foram incubadas à 30°C por um período máximo de 7 dias resultando, na interface líquido-ar, em membranas geleificadas que foram lavadas em água deionizada, e tratadas com solução de hipoclorito a 3%(figura 4) (MELLO ET AL, 1999, PATTERSON-BEEDLE et al,2000, NÉRIS,2007).

As biomembranas sintetizadas pela bactéria *Zoogloea sp.* em mosto de melação de cana-de-açúcar apresentaram aproximadamente 88% de solubilidade em ácido trifluoracético, sendo os principais monossacarídeos presentes na fração solúvel à glicose (87,6%), xilose (8,6%), manose (0,8%), ribose (1,7%), galactose (0,1%), arabinose (0,4%), e ácido glicurônico (0,8%), representados pela tabela 1 (PATERSON-BEEDLE et al., 2000).

Tabela 1. Composição de monossacarídeos das frações solúveis produzidas por hidrólise ácida com trifluoracético sob condições moderadas e fortes, determinadas através de CLAE (Paterson-Beedle et al., 2000).

MONOSSACARÍDEOS	TOTAL (p/p)
Fucose	0,01
Arabinose	0,37
Galactose	0,13
Glicose	87,57
Xilose	8,58
Manose	0,82
Ribose	1,68
Ácido glicurônico	0,83

Através de método de calorimetria diferencial exploratória (DSC), a biomembrana apresentou uma temperatura de fusão cristalina bem definida (118°C), propriedade que indica a relativa pureza do material (ARGÔLO, 2002). A caracterização da membrana por

micrografia eletrônica mostra que a mesma possui superfícies rugosas e fibrosas, compatíveis de celulose (CAVALCANTE et al, 2006).

2.5.2- Aplicações biomédicas da membrana de biopolímero

Nos últimos anos, o Grupo de Pesquisa do Biopolímero da cana-de-açúcar vem desenvolvendo várias pesquisas com experimentação animal. O primeiro estudo realizado em animais foi com a avaliação da atividade cicatrizante utilizando as biomembranas (MBP) sem tratamento, em cães. Foi observado que a membrana formou uma película estável nas feridas, provocando uma hipertonicidade no local, diminuindo o risco de infecções por microorganismos e reepitelização do local lesado (COELHO et al, 2002).

Castro e colaboradores (2004) realizaram estudo sobre a citotoxicidade *in vitro* da biomembrana, através da bactéria *Zoogloea sp.*, por meio do índice de adesividade de macrófagos, de morte celular e produção de óxido nítrico, que apresentou 87%, 40,0 mMol e 95,3%, respectivamente frente aos três ensaios, permitindo a utilização desses materiais em ensaios *in vivo* com segurança.

A aplicação das biomembranas no tratamento de uretroplastia e na doença de Peyronie demonstrou que a mesma apresenta reação inflamatória em menor grau e nenhuma do tipo de corpo estranho (CHAGAS et al, 2006, VILAR et al, 2006). Com comportamento semelhante em técnica de miringoplastia em chinchilas, a biomembrana apresentou uma aceleração na regeneração da membrana timpânica, baixa reação do tipo corpo estranho, sendo um possível biomaterial para reverter lesões da membrana timpânica (SILVA et al, 2006).

Em 2006, Cavalcante e colaboradores (2006) utilizaram a MBP como matriz reutilizável de imobilização de tripsina. A imobilização do tipo MBP-tripsina-BSA apresentou 99% de atividade inicial, manteve-se após 54 dias quando conservada a 4°C em tampão 0,1M Tris-HCl pH 8,0, mostrando também sua capacidade de reutilização, tornando viável a utilização da biomembrana como suporte para imobilização de proteínas.

Aguiar e colaboradores (2007) propuseram o uso da biomembrana como remendo em arterioplastias femorais. O estudo foi realizado em cães, utilizando a membrana de biopolímero como enxerto e a membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e),

como controle positivo. Após 180 dias, observou-se 100% de sobrevivência dos animais, com ausência de infecções, trombose, processo degenerativo e calcificação. Entretanto, no grupo em que foram utilizados PTFE-e, houve invasão de fibroblastos, devido à presença de microporos em sua estrutura. Nos remendos do biopolímero, isso não foi observado, mas sim uma aderência das novas camadas íntima e adventícia do tecido. A conservação da estrutura de ambos os remendos no processo de arterioplastia utilizando os mesmos materiais foi comprovada por Lins e colaboradores (2007), utilizando a técnica de velocimetria Doppler e arteriografia. Foi observada ausência de dilatação das artérias e manutenção do diâmetro das artérias femorais no local do implante de ambos os biomateriais.

Em 2008, Falcão e colaboradores realizaram estudos comparativos de membranas de celulose bacteriana produzidas pela *zoogloea sp.* e membranas de PTFE-e para corrigir defeitos abdominais com diminuição da tensão durante o processo de reparo. O ensaio foi realizado em ratos Wistar durante 60 dias com leituras em 14, 28 e 60 dias. Os animais foram sacrificados e realizada a necropsia com cortes histológicos dos grupos de cada material corado eosina-hematoxilina (HE) e Tricromo de Masson. Os cortes histológicos com ambos os corantes demonstraram que a celulose bacteriana incorporou-se ao tecido por encapsulação com ausência de infiltrado e migração de fibroblastos. Entretanto, quando comparados com membranas de PTFE-e, observa-se infiltrada no tecido a presença de fibras colágenas.

Apesar da ausência de infiltrado e uma melhor resposta ao processo cicatricial, ensaios biomecânicos desenvolvidos pelo mesmo grupo demonstraram que a membrana de PTFE-e possui maior resistência na interface tecido-membrana que a celulose bacteriana. Esse fenômeno se deve ao processo inflamatório invasivo durante a cicatrização do biomaterial sintético e a diferença de porosidade entre as biomembranas (NETO et al, 2008).

2.5.3-Gel biopolímero

As propriedades de intumescimento de polissacarídeos também podem ser atribuídas às celulosas bacterianas. A alta hidrofiliabilidade das biomembranas é explanada pela presença de espaços intersticiais e até mesmo túneis na matriz retentora de água, onde seu grau de retenção pode chegar até 1000% (KLEMM et al, 2001). A partir desse processo

de hidratação das membranas, foi desenvolvido um gel pela quebra da MBP pelo processo de sonicação, como demonstrado na figura 5. Esse produto tem sido estudado para diversas aplicações (NÉRIS, 2007; LIMA et al, 2004).



Figura 5. Biogel obtido através da membrana de Biopolímero produzido pela *zoogloea sp.* (NÉRIS, 2007; LIMA et al, 2004).

Em estudo experimental em cães para o tratamento de refluxo vesicouretral, foi utilizado o gel de biopolímero implantado na bexiga na região parauretral dos animais (RANGEL et al, 2006).

Os resultados promissores na aplicação em animais com a MBP e o biogel permitiram o desenvolvimento de uma forma farmacêutica utilizando o biogel como carreador de drogas. Nérís (2007) incorporou o ácido úsnico ao gel de biopolímero. Sua caracterização térmica por calorimetria diferencial exploratória (DSC) na forma de filme, mostra um pico de fusão endotérmico máximo de 116,4°C. A análise com ácido úsnico incorporado obteve o pico de fusão máximo com 200,6°C. A análise termogravimétrica (TGA/DTG) do gel na forma de filme, puro e com AU. Os resultados demonstram que a incorporação do ácido úsnico não altera as propriedades térmicas do biopolímero, frente à sua temperatura de degradação, pois se iniciam em períodos diferentes (167°C para o biopolímero e 204° para o AU). A análise de sua superfície por microscopia de força atômica (AFM) mostra uma superfície lisa, homogênea, compacta, fibrosa e o ácido úsnico bem distribuído, com ausência de cristais.

3.OBJETIVOS

3.1-Geral

Desenvolver e caracterizar um biocompósito para reparos ósseos de biopolímero obtido por meio da fermentação do melaço da cana-de-açúcar utilizando o microorganismo **zoozglea sp.**

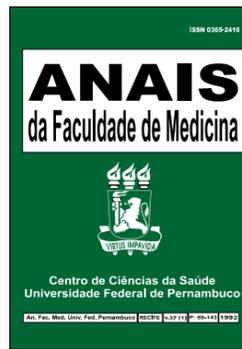
3.2-Específicos

1. Desenvolver do biocompósito a partir do biopolímero com e sem ativação de Hidróxido de Cálcio;
2. Avaliação da nucleação e deposição de hidroxiapatita utilizando a solução simuladora de fluido corpóreo;
3. Caracterizar morfologicamente o processo de nucleação e deposição de hidroxiapatita no biocompósito e microanálise de raio-x por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) dos elementos presentes na superfície do biocompósito;

4. METODOLOGIA

Submissão do artigo:

1. Nucleação de fosfato de cálcio em biocompósito de biopolímero produzido por *Zoogloea* sp.
Submissão: Revista Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco



ISSN 03652416

Endereço eletrônico: www.anaisdemedicina.revistaonline.org

Nucleação de fosfato de cálcio em biocompósito de biopolímero produzido por **Zoogloea**
sp.

Calcium phosphate nucleation in biocomposite of biopolymer produced by **zoogloea sp.**
Catarine Bezerra Cavalcanti^{1,2}; Débora Máximo das Neves Luna²; Nereide Stela Santos
Magalhães^{1,2}; José Lamartine de Andrade Aguiar^{3*}

1. Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Universidade Federal de
Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária,
50670-901, Recife, PE, Brasil;

2. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPE
Av. Prof. Arthur Sá, s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil;

3. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, UFPE
Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Hospital das Clínicas, Bloco A, Térreo, Cidade Universitária,
50670-901, Recife, PE, Brasil;

*Autor correspondente:

Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Departamento de Cirurgia Experimental

Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária,

50670-901, Recife-PE, Brasil.

Endereço eletrônico: aguiarjl@terra.com.br

Resumo

Um exopolissacarídeo produzido pelo microorganismo *Zoogloea sp.* obtido por fermentação do melado de cana-de-açúcar foi utilizado como matéria prima para o desenvolvimento de biocompósito para reparo ósseo com e sem ativação de Ca(OH)_2 . A nucleação de fosfato utilizando a solução simuladora do fluido corpóreo (SBF) foi estudada durante 28 dias. O processo de nucleação e deposição de hidroxiapatita (HA) foi comprovado pela técnica de microscopia eletrônica de varredura acoplada à espectroscopia de energia dispersiva (MEV-EDS). A análise morfológica dos biocompósitos com e sem ativação demonstraram a deposição de hidroxiapatitas em velocidades e morfologias diferentes de acordo com o processo de ativação. A microanálise por EDS comprovou qualitativamente a deposição de hidroxiapatita através da identificação dos elementos químicos e íons responsáveis pela nucleação, demonstrando que o processo de ativação dos biocompósitos com Ca(OH)_2 acelera a deposição de HA. Os resultados preliminares sugerem uma possível utilização do biocompósito como implantes ósseos e ou em engenharia de tecidos ósseos.

Palavras-Chaves: Biocompósito, Biopolímero, *Zoogloea sp.*, Nucleação, Hidroxiapatita.

Abstract

Exopolysaccharide produced by a microorganism *Zoogloea sp.* sugar cane molasses was used as material for the development of biocomposite to bone repair with and without activation of Ca(OH)_2 . The calcium phosphate nucleation was studied using a solution simulating the body fluid (SBF) for 28 days. The process of nucleation and deposition of hydroxyapatite (HA) was confirmed by the technique of scanning electron microscopy coupled to energy dispersive spectroscopy (SEM-EDS). The morphological analysis of biocomposites with and without activation showed the hydroxyapatite in different times and morphologies according to the activation process. The EDS microanalysis showed qualitatively by the deposition of hydroxyapatite through the identification of chemical elements and ions responsible for nucleation, showing that the activation process of biocomposites with Ca(OH)_2 accelerates the deposition of HA. Preliminary results suggest a possible use of biocomposite for as bone implants and bone tissue engineering.

Keywords: Biocomposite, Biopolymer, *Zoogloea sp.*, Nucleation, Hydroxyapatite.

Introdução

Biomateriais para reparos ósseos precisam apresentar propriedades mecânicas similares ao osso e dar suporte à regeneração óssea. Além disso, devem possibilitar a adesão, proliferação e diferenciação celular¹ e ainda a formação de camadas de hidroxiapatita nas superfícies desses materiais como substitutos ósseos quando acoplados a superfícies do corpo vivo que é a condição essencial¹⁻⁴. É sabido que o osso é um biocompósito natural de hidroxiapatita (HA), dispostos de cristais minerais orgânicos em uma matriz de colágeno²⁻⁵. O desenvolvimento de compósitos poliméricos apatita-orgânicos é um atrativo de vários métodos de fabricação de biomateriais como substituto ósseo, e tentativas de utilizar polímeros naturais como matrizes orgânicas, como o colágeno, seda fibrina e quitosana foram efetuadas^{6, 7}. Dentre os polímeros naturais utilizados, a celulose bacteriana (CB) tem sido bastante reportada. Possui composição química idêntica à da celulose natural; a celulose bacteriana possui cristalinidade, livre de ligninas, hemiceluloses e impurezas. Ainda assim, a CB possui muito mais altas propriedades mecânicas, incluindo força e resistência e alta biocompatibilidade, o que elimina a ocorrência de infecções cruzadas. Diversos microorganismos são capazes de produzir a celulose bacteriana, como, Algae (*Vallonia*), fungi (*Saprolegmia*, *Dictyostelium discoideum*) ou bactérias (*Acetobacter*, *Achromater*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Alcaligenes*, *Zoogloea*). Entretanto, nem todas as espécies citadas são capazes de produzi-las e secretá-las como fibra extracelular⁸.

Um exopolissacarídeo produzido pelo microorganismo *Zoogloea sp.* utilizado como meio fermentativo, o melaço de cana-de-açúcar, foi obtido como uma membrana fibrosa branca translúcida. Esse biopolímero foi caracterizado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, que apresenta o seguinte perfil monossacarídico: glicose (87,6%), xilose (8,6%),

manose (0,8%), ribose (1,7%), galactose (0,1%), arabinose (0,4 %), e ácido glucoronico (0,8%). Devido à presença de resíduos (1 → 4)-β-D-glucopiranosil, corroborada pela hidrólise enzimática com celulase, biopolímero pode ser considerado como um exopolissacarídeo celulósico⁹. A biocompatibilidade do biopolímero foi previamente estabelecida¹⁰ e utilizada como um filme matriz de imobilização da Tripsina¹¹. Seus estudos mais amplos são na área biomédica, como biomateriais em procedimentos cirúrgicos, como miringoplastia¹², angioplastia de artéria femoral¹³ e correções abdominais¹⁴.

Técnicas de avaliação de recobrimentos de apatitas **in vitro** em implantes constituem uma prática muito recorrente, devido às dificuldades experimentais e éticas inerentes aos procedimentos **in vivo**, vários procedimentos foram propostos para se testar a bioatividade de materiais sintéticos¹⁵. Em 1991, Kokubo e colaboradores desenvolveram uma solução chamada **Simulation Body Fluid**, com concentrações semelhantes ao fluido plasmático para formação de apatitas na superfície de implantes¹⁶, sendo padronizada em 2005 pelo comitê técnico ISO/TC150¹⁷, **International Organization for Standardization**, como uma solução **in vitro** para a formação de apatita em implantes para reparos ósseos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento de um bicomposto para reparos ósseos, utilizando como matéria prima biomembranas celulósicas produzidas pelo microorganismo **Zoogloea sp.**

2. Procedimento Experimental

2.1. Materiais

Membranas de biopolímero produzido por *Zoogloea sp.* foram fornecidas pela Estação Experimental da Cana-de-Açúcar em Carpina, Universidade Federal Rural de Pernambuco; Brasil; hidróxido de cálcio (Vetec, Brasil).

2.2. Métodos

2.2.1. Obtenção de Biocompósito

Biocompósitos foram produzidos por moldagem artificial de biomembranas de biopolímero. Os biocompósitos obtidos possuem 1 cm de altura e 1mm de diâmetro.

2.2.2. Obtenção de Biocompósito ativado com hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2).

Biocompósitos ativados com hidróxido de cálcio na concentração de 0,03% foram produzidos por moldagem artificial de biomembranas de biopolímero. Os biocompósitos obtidos possuem 1 cm de altura e 1mm de diâmetro.

2.2.3. Avaliação da nucleação e precipitação de hidroxiapatita na superfície do biocompósito

Inicialmente uma solução SBF convencional foi preparada de acordo com metodologia descrita na proposição da norma internacional ISO (ISO, FDIS 23317, 2005)¹⁷. Os reagentes foram adicionados lentamente à água deionizada (Mili-Q plus, Millipore USA) na ordem preconizada, como demonstrado na Tabela 1, sob agitação magnética a 37°C . Após cada adição de reagente, foi aguardada a completa dissolução para a próxima adição do

reagente subsequente. O pH da solução foi ajustado em 1,4 com HCl (aproximadamente 40 mL), antes de adicionar o CaCl₂. O pH final da solução foi ajustado para 7,40 por titulação de HCl 0,1M. Terminado o preparo, a solução foi submetida à filtração por pressão positiva e armazenada em frasco de polietileno a uma temperatura de 4°C.

Tabela 1. Composição, pureza e quantidade de eletrólitos necessária para obtenção de 1 litro de solução SBF. (ISO 23317,2005).

Ordem	Reagentes	Quantidade (g)	Pureza (%)
1°	NaCl	8,035	99,5
2°	NaHCO ₃	0,355	99,5
3°	KCl	0,225	99,5
4°	K ₃ HPO ₄ .3H ₂ O	0,231	99,0
5°	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,311	98,0
6°	HCl 1,0 M	-	-
7°	CaCl ₂	0,292	95,0
8°	Na ₂ SO ₄	0,072	99,0
9°	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6,118	99,0
10°	HCl 1,0 M	0-5	-

Cilindros de biocompósitos foram imersos em frascos de polietileno contendo 6,9 mL da solução SBF (pH 7,4) a 37°C . O volume da solução adequado para imergir os cilindros foi determinado mediante a seguinte relação expressa na equação 1 (ISO FCDIS 23317, 2005).

$$V_s = S_a / 10 \text{ onde} \quad \text{(Equação 1)}$$

V_s = Volume SBF (mm³)

S_a = área total da superfície da amostra

As amostras de biocompósito ficaram em contato com a solução SBF durante 28 dias e foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (EDS) após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão, após lavagem com água deionizada e secagem a temperatura ambiente.

Uma solução de SBF foi utilizada nas mesmas condições como controle (sem amostras) e avaliada macroscopicamente nos mesmos intervalos de tempo para observação de uma possível precipitação de hidróxido de cálcio.

2.2.5 Caracterização morfológica e microanálise do biocompósito.

Amostras de biocompósito foram selecionadas e analisadas antes e após a imersão na solução SBF nos seguintes tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias após a imersão. A morfologia dos biocompósitos foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e a microanálise química por MEV associada à espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS), utilizando microscópio JSM 5900 (JEOL, Japão), acoplado a espectrofotômetro de energia dispersiva de raios X (sensor Noran Instruments Inc.,EUA, modelo 695A-1SPS e software Easymicro Voyager digital microanálise, versão 5.2 Buid 63,1998). As amostras foram pulverizadas com ouro coloidal (5-10 nm), utilizando corrente de 40 mA durante 25 s. As imagens foram obtidas com voltagem de 20 Kv., distância focal 10 mm e spot size 40 de acordo com a área de interesse para o estudo.

Áreas das micrografias do biocompósito mostrando a presença de hidroxiapatita foram selecionadas para análise química de elementos (C, P, O, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ e Cl⁻). Os feixes de elétrons emitidos pelo equipamento na superfície da amostra são refletidos sob a forma de raios-X detectados pelo sensor que identifica e diferencia cada elemento químico da composição do biomaterial.

3. Resultados e discussão

3.1 Análise morfológica do biocompósito em contato com solução SBF.

A Figura 1 mostra o processo de formação de hidroxiapatita na superfície do biocompósito sem e com ativação com Ca(OH)_2 durante 28 dias de imersão em solução SBF. Na figura 1A, é mostrada a superfície do biocompósito não ativado antes da imersão. Nota-se uma grande porosidade do material com falhas em toda a sua superfície. Nesse material, devido à alta porosidade e à falta de ativação da membrana, a nucleação de fosfato ocorre lentamente com distribuição pouco homogênea e não ocorre apenas na superfície, mas sim no interior de suas fraturas (Figuras 1c, e, g) para os tempos de imersão de 7, 14 e 28 dias, respectivamente. Nos biocompósitos ativados no mesmo período de imersão (Figuras 1 d, f, g), o processo de nucleação e deposição de hidroxiapatita ocorre de forma mais rápida e homogênea em aglomerados e formas multivariadas de seus cristalitos.

O hidróxido de cálcio constitui-se em uma base forte obtida a partir da calcinação (aquecimento) do carbonato de cálcio, até sua transformação em óxido de cálcio (cal viva). Ele apresenta ação direta e específica sobre enzimas, em decorrência de seu elevado pH, atuando como ativador enzimático tecidual via fosfatase alcalina, adenosina trifosfatase e a pirofosfatase, favorecendo o efeito mineralizador¹⁸. O Ca(OH)_2 é utilizado desde a década de 30 em procedimentos odontológicos de endodontia como forrador cavitário e como agente de capeamento pulpar¹⁹. Seu uso também tem sido importante como solução ativadora para suportes de culturas celulares compostos de celulose para engenharia de tecidos ósseos e cartilagem²⁰.

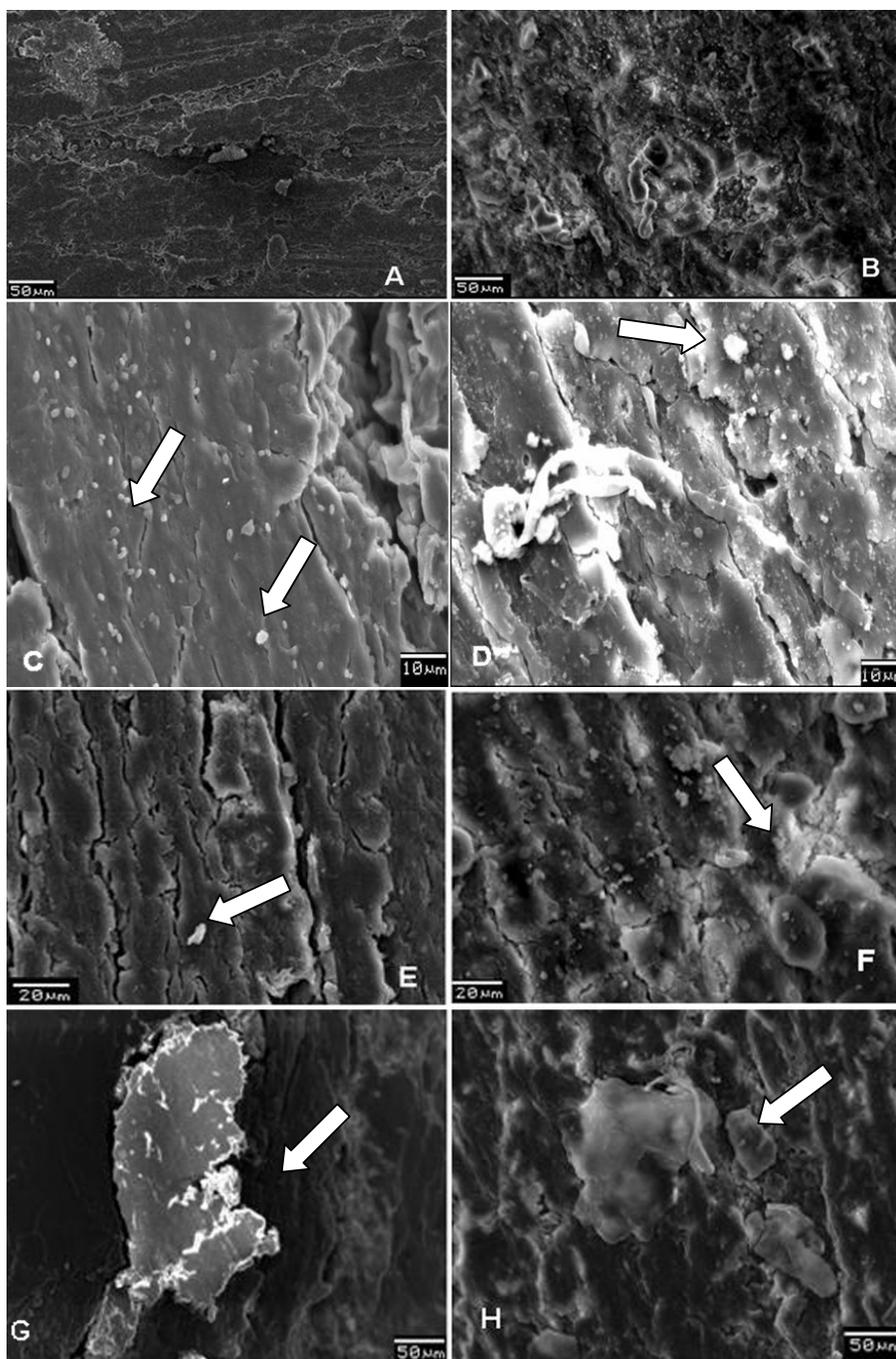


Figura 1. Micrografias MEV de amostras de biocompósito (a,c,e,g) e do bicompósito ativado com Ca(OH)_2 (b,d,f,h) durante imersão em solução SBF por 28 dias para avaliação de depósito de hidroxiapatita: (a,b) antes da imersão; (c,d) 7 dias (e,f) 14 dias e (g,h) 28 dias após a imersão.

A biomineralização envolve a nucleação inicial e subsequente crescimento de apatitas de soluções aquosas. Os grupos funcionais presentes na superfície dos materiais desempenham papel decisivo em ambos para a nucleação e o crescimento de apatitas. Pesquisas têm sido realizadas para elucidar mecanismos de formação de apatitas sobre uma superfície externa e determinar sua dependência substrato²¹. As superfícies dos substratos devem ser dotadas de grupos funcionais bioativos com capacidade para estimular a nucleação de fosfato de cálcio a fim de induzir a formação de apatitas em soluções SBF. Exemplos desses grupos funcionais são silanol grupo²², titanato de sódio, hidrogel camada²³ e fosfato grupo²⁴. As propriedades superficiais dos biomateriais são primordiais para a osteogênese, pois, em alguns casos, é preferida a inibição da formação de apatita, como no sangue ou quando um implante artificial entra em contato com a superfície do órgão. Quando o implante está associado ao tecido aderido à superfície, a formação de apatita se faz necessária²¹.

3.2 Microanálise de raio X por dispersão de energia (EDS) do biocompósito.

A análise química MEV-EDS do biocompósito sem ativação e ativado com hidróxido de cálcio em contato com solução SBF efetuada após 14 e 28 dias de imersão (Figura 2) demonstrou a nucleação e deposição de hidroxiapatita na superfície do biocompósito com ou sem tratamento prévio com Ca(OH)_2 , sendo mais intensa no caso do biocompósito ativado (Fig.2b,d). A emissão sob a forma de raios-X possui uma energia única para cada elemento químico, o que permite sua identificação e diferenciação nas superfícies dos materiais.

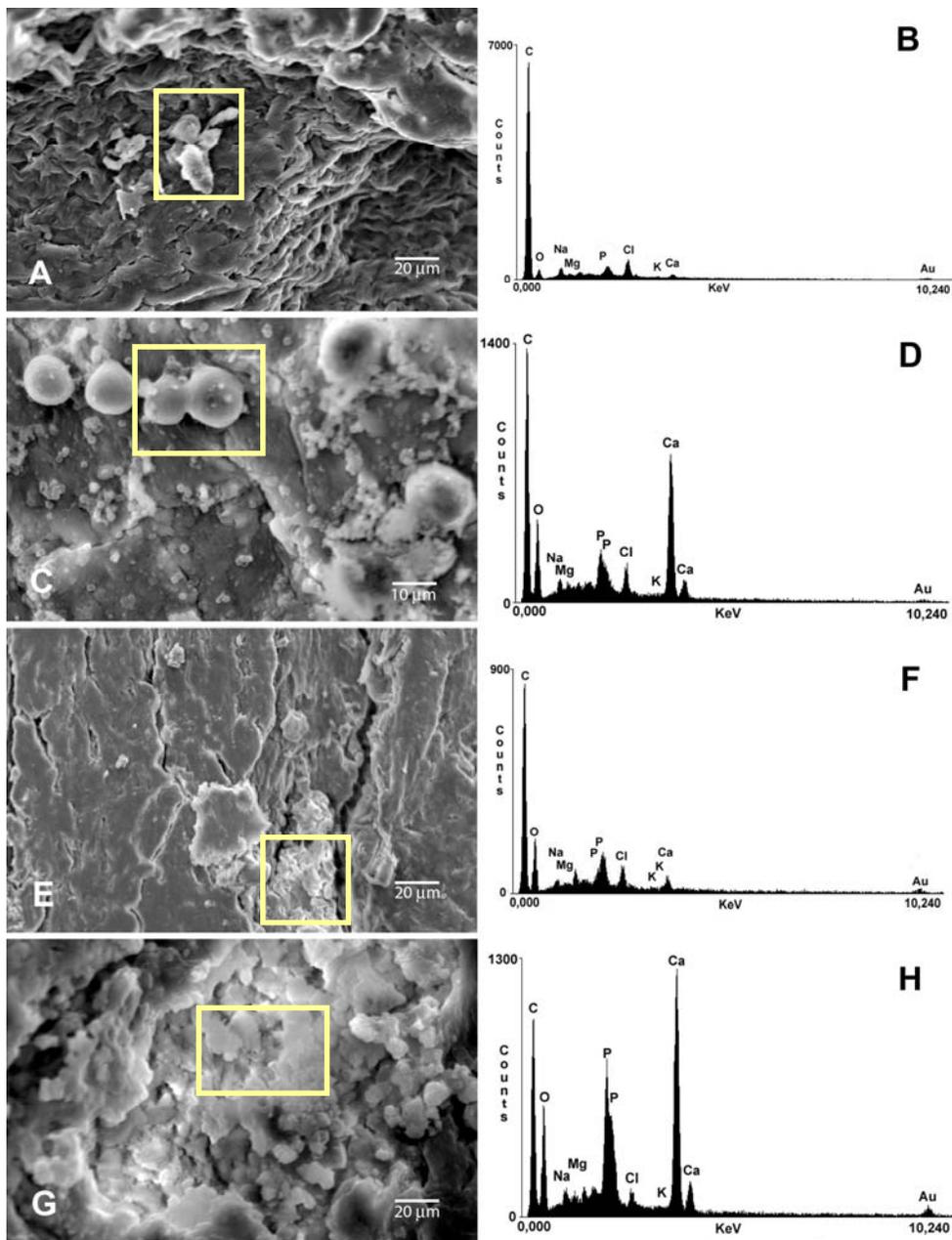


Figura 2. Microanálise utilizando MEV associada à espectroscopia de energia dispersiva da nucleação de hidroxiapatita em biocompósito sem ativação (a-d) e biocompósito ativado com Ca(OH)_2 (e-h) durante imersão em solução SBF por 28 dias: (a,b) e (e,f) 14 dias e (c,d) e (g,h) 28 dias após a imersão, respectivamente.

Na superfície dos biocompósitos, observou-se nos espectros a presença de elementos e íons responsáveis pelo processo de nucleação e deposição HA. A troca dos íons entre a solução SBF e os grupos terminais do material do biocompósito celulósico, como as hidroxilas terminais da celulose. A ativação com Ca(OH)_2 durante o desenvolvimento do biocompósito permitiu a ligação deste com suas porções terminais, acelerando o processo de ativação.

A ativação da celulose bacteriana para ensaios biomiméticos é reportada na literatura. Wan e colaboradores^{21, 25, 26} relatam que o pré-tratamento das biomembranas de celulose produzidas pela *Acetobacter xylinum* com cloreto de cálcio e ácido fosfórico ou modificação química da celulose auxilia no processo de nucleação de fosfato e formação de apatitas de forma homogênea em sua superfície quando imersos em soluções.

Além da ativação da superfície celulósica, outros fatores influenciam no processo de nucleação de fosfato de cálcio como o formato do compósito e sua superfície, o que faz com que, nos compósitos sem cálcio, o processo de nucleação de fosfato e precipitação de hidroxiapatita tenha sido menos homogêneo e mais demorado no período de imersão de 28 dias.

4. Conclusões

Biocompósitos foram obtidos a partir de biopolímero produzido por *Zoogloea sp.* para utilização como substituto ósseo. A análise morfológica e química de biocompósitos não ativados e ativados e com Ca(OH)_2 foi efetuada através da observação da nucleação e depósito de hidroxiapatita após imersão em solução simuladora do fluido corpóreo (SBF). Os resultados revelaram que o tratamento do biocompósito com Ca(OH)_2 promove maior nucleação de fosfato de cálcio e precipitação de cristais de hidroxiapatita na superfície das

do biocompósito, preenchendo as regiões porosas na superfície onde a comprovação de sua composição e fase deve ser complementada pelos ensaios de difração de raios-X. Esses resultados permitem a utilização do biocompósito como substituto ósseo em implantes.

Referências

1. Seal, B.L.; Otero, T.C.; Panitch, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Sci. and Eng.R.* 2001; 34 147-230.
2. Miyaji F; Kim HM., Handa S; KokuboT; Nakamura T. " Bonelike apatite coating on organic polymers: novel nucleation process using sodium silicate solution. *Biomaterials* 1999; 20 913-919.
3. Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 1991; 74 1487-1510.
4. Kokubo T. Recent progress in glass-based materials for biomedical applications. *J Ceram Soc Japan* 1991;99:965-973.
5. Kokubo T. Bioactive glass ceramics, properties and applications. *Biomaterials*, 1991; 12 155-163.
6. Jiang L, Li Y , Wang X, Zhang L, Wen J; Gong M. Preparation and properties of nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose composite scaffold *Carbohydrate Polymers* 2008; 74 680–684.
7. Svagan AJ, Samir MASA, and Berglund LA. Biomimetic Polysaccharide Nanocomposites of High Cellulose Content and High Toughness *Biomacromolecules* 2007; 8 2556-2563.
8. Klemm,D., Schumamm,D.; Udhardt,U.; Marsch,S. Bacterial Synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science.* 2001; 26 1561-1603.

9. Paterson-Beedle, M.; Kennedy, J.F.; Melo, F.A.D.; Lloyd, L.L.; Medeiros, V.; A cellulosic exopolysaccharide produced from sugar cane molasses by a **Zoogloea sp.** Carbohydrate Polymers, 2000; 42 375-383.
10. Castro C.M.M.B.; Aguiar, J.L.; Melo F.A.D.; Silva, W.T.F.; Marques, E.; Silva, D.B.; Citotoxicidade de polímero de cana-de-açúcar. Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco. 2004; 2 39 119-123.
11. Cavalcante, A.H.M.; Carvalho JR., L.B.; Carneiro da Cunha, M.G.; Cellulosic Exopolysaccharide produced by **Zoogloea sp.** as a film support for trypsin immobilisation. Biochemical Engineering Journal. 2006; 29 258–261.
12. Silva DB; Aguiar JLA; Marques, A.; Coelho ARB.; Rolim Filho EL. Miringoplastia com enxerto livre de membrana de biopolímero de cana de açúcar e fâscia autóloga em **Chinchilla laniger**. Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco, 2006; 1 51 45-51.
13. Aguiar JLA, Lins EM, Marques SR. , Coelho ARB, Rossiter RO, Melo RJV; Surgarcane biopolymer patch in femoral artery angioplasty on dogs. Acta cirúrgica Brasileira, 2007; 1 22 77-81.
14. Coelho ARB; Neto JE; Falcão SC. Incorporation by host tissue of two biomaterials used as repair of defects produced in abdominal wall of rats. Acta Cirúrgica Brasileira. 2008; 1 23 78-83.
15. Andrade AL; Zacarias D R Cerâmicas Bioativas-Estado da arte. Quim. Nova, 2006 1 9 100-104.
16. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? Biomaterials. 2006; 27 2907–2915.

17. ISO FDIS 23317. Implants for surgery - In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials. 2005.
18. Estrela AC.; Figueiredo JAP. Endodontia: princípios biológicos e mecânicos. 1ª Ed., São Paulo: Artes Médicas, 1999 82-83, 819.
19. Chain MC; Chain JB; Cox CC. Hidróxido de cálcio: uma revisão crítica Revista Brasileira de Odontologia; 1997; 54 5 306-11.
20. Müller A., Müller L., Hofmann II, Greil P., Wenzel, MM., Staudenmaier R. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2006; 27 3955–3963.
21. Wan YZ. Y. Huang, Yuan CD , Raman S, Zhu Y, Jiang H.J , HF; GaoC. Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*. 2007; 27 855–864.
22. Yokogawa Y, Toriyama M, Kawamoto Y, Nishizawa K, Nagata F, Kameyama T, et al. Calcium phosphate compound-cellulose fiber composite material prepared in soaking medium at 36.5°–60 °C. *J. Mater Res* 1998; 13:922–5
23. Dalas E, Kallitsis JK, Koutsoukos PG. Crystallization of hydroxyapatite on polymers. *Langmuir* 1991; 7 1822–26.
24. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Bonding strength of bonelike apatite layer to Ti metal substrate. *J Biomed Mater Res Part B* 1997; 38 121–7.
25. Wan YZ, Hong, L, Wang YL, Jia SR., Huang Y., Gao C., Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route. *Materials Letters* 2006 60; 1710–1713.

26. Wan YZL, Hong SR , Jia Y , Huan Y.; Zhu YL. Wang HJ. Jiang C. Synthesis and characterization of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites. *Composites Science and Technology*. 2006; 66 1825–1832.

5. CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada, conclui-se que:

- A partir do biopolímero da cana-de açúcar foram obtidos biocompósitos com e sem ativação com hidróxido de cálcio;
- Através da análise micrográfica e microanálise de energia dispersiva de raios-X, foi observado que houve a formação de hidroxiapatita em formas multivariadas com maior expressão no biocompósito ativado com Ca(OH)_2 em ambos os biocompósitos;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARGÔLO, E.J.; Avaliação da capacidade biodegradadora de fungos em filmes poliméricos. Recife. 79 folhas **Dissertação (mestrado)** - Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Engenharia Química. 2002.

AGUIAR, J.L.A.; LIMA FILHO, J.F.C.; COELHO, A.R.B, CÂMARA NETO, R.D.C.; MELO F.A.D.; **Patente Brasileira** MU8402142-0. 2004.

AGUIAR J L. A, LINS E M, MARQUES S.R., COELHO A. R.B, ROSSITER R O, MELO R JV; Surgarcane biopolymer patch in femoral artery angioplasty on dogs. **Acta cirúrgica Brasileira, Vol 22 (Supplement 1) 2007 – 77-81** .

BEPPU, M.M. Estudo de calcificação **in vitro** de quitosana. **Dissertação de Mestrado**. São Paulo. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 1999.

BERGLUND, L.A.; SVAGAN, A.J., MY, A.S; SAMIR, A. biomimetic polysaccharide nanocomposites of high cellulose content and high toughness. **Biomacromolecules**. 2007, v.8, 2556-2563.

BERWANGER, A.L.S. Produção e caracterização de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata*. **Dissertação de Mestrado**. Campos Erechin.Universidade Regional Integrado Alto Uruguai e das Missões, URI. 2005.

BORGES, C. D.; MOREIRA, A. N; MOREIRA, A.S., DEL PINO, F. A.B.; VENDRUSCOLO, C.T. 2004. Caracterização de biopolímeros produzidos por *Beijerinckia* sp. 7070 em diferentes tempos de cultivo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 24: 327-332.

CAO, W., HENCH, L.L. "Bioactive materials", **Ceramics International**, v. 22, n.6, pp. 493-507.1996.

CASTNER, D.G., RATNER, B.D., 2002, "Biomedical surface science: Foundations to frontiers", **Surface Science**, v. 500, n. 1-3, pp. 28-60.

CASTRO, C.M.M.B.; AGUIAR, J.L.; MELO F.A.D.; SILVA, W.T.F.; MARQUES, E.; SILVA, D.B.; Citotoxicidade de polímero de cana-de-açúcar. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v.39(2), p. 119-123, 2004.

CAVALCANTE, A.H.M.; Imobilização de Tripsina Em Membranas produzidas por *Zoogloea* sp. **Dissertação de Mestrado**, Recife, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE,Departamento de Bioquímica, p.15, 2005.

CAVALCANTE, A.H.M.; CARVALHO JR., L.B.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; Cellulosic Exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. as a film support for trypsin immobilisation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 29, p. 258–261, 2006.

CHAGAS, H.M.; AGUIAR, J.L.; MONTORO, M.; VILAR, F.; PIRES, J.A.; PEREIRA, L.A.; ANDRADE, R.; LIMA, S.V.C.; Uretroplastia com biopolímero da cana-de-açúcar em cão. **International Brazillian Journal of Urology**, v. 32(2), p. 65, June, 2006.

COELHO,A.R.B; NETO,J.E.; FALCÃO,S.C. Incorporation by host tissue of two biomaterials used as repair of defects produced in abdominal wall of rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.23 (1). 2008.

CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKIA, S.; MALCOLM, R.B.J.; Microbial cellulose: the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, p. 145–151, 2006.

CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN, R. M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v.8, n.1, p.1-12. 2007.

DOMINGUES, R. Z.; ANDRADE, A.L. Cerâmicas Bioativas: Estado da Arte. **Química nova**. v. 29, n. 1, 100-104, 2006.

FRICAIN J.C. GRANJAP. L, BARBOSA; M.A., JÉSO, B. DE, BARTHE, N; BAQUEY C.; Cellulose phosphates as biomaterials. In vivo biocompatibility studies. **Biomaterials**. v.23 , p.971–980, 2002

GEORGE, J; RAMANA, K.V.; SABAPATHY, S.N., BAWA, A.S. Physico-mechanical properties of chemically treated bacterial (*Acetobacter Xylinum*) cellulose Membrane. **World journal of microbiology & Biotechnology**. v.21 1323-1327. Doi: 10.1007/s11274-005-3574-0. 2005

GOELZER, F.D.E.; FARIAS-TISCHER, P.C.S.; VITORINO, J.C., SIERAKOWSKI, M.R; TISCHER, C.A. Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose form *Acetobacter Xylinum* from processed rice bark. **Materials Science Engineering C**. doi: 10.1016/j.msec.2008.10.013. 2008

GU, L.; ZHA, C.; JIN, H. Direct dissolution of cellulose in NaOH/thiourea/urea aqueous solution. **Carbohydrate Research**. v.342, p 851-858, 2007.

GURGEL, L.V.A.; Merceirização e modificação química de cellulose e bagaço de cana-de-açúcar com anidrido succínico e trietilenotetramina: Preparação de novos materiais quelantes para a adsorção de Pb(II),Cd(II),Cr(IV),Cu(II). **Dissertação de Mestrado**. Ouro Preto. Universidade Federal de Ouro Preto, 2007.

HAAG, A.P.; MAIERC, R.M.; COMBIED, J.; GEESEYA, G.G.; Bacterially derived biopolymers as wood adhesives. **International Journal of Adhesion & Adhesives**, v. 24, p. 495–502, 2004.

HENCH, L.L., WILSON, J. **An Introduction to Bioceramics**. World Scientific Publishing Company. 1993.

HOFMANN I.; MÜLLER L., GREIL, P., MULLER F. A.. Calcium phosphate nucleation on cellulose fabrics. **Surface & Coatings Technology**. v.201;p. 2392–2398. 2006

JANG,J.H.; BAE,S.K.; LIM,D.J.; KIM,B.J,KONG J.Y. Rheological properties of polysaccharides produced by a *Zoogloea sp.* **Biothecnology Letters**, v.24; p.297-301, 2002.

JARCHO, M., "Retrospective analysis of hydroxyapatite development for oral implant applications", **Dental.Clinical.North American.**, v. 36, n. 1, pp. 19-26, 1992.

KANG, J.; SCHWENDEMAN, S. P.; Comparison of the effects of Mg(OH₂) and sucrose on the stability of bovine serum albumin encapsulated in injectable poly (D,L-lactide-co-glycolide) implants. **Biomaterials**, v.23, p.239-245, 2002.

KHACHATOORIAN, R.; PETRISOR, I.; KAWAN, C.; YEN, T. F.; Biopolymer plugging a effect: laboratory-pressuired pumping flow studies. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 38, p. 13-21, 2003.

KLEMM, D., SCHUMAMM, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial Synthesized cellulose- artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**. V.26 p.1561-1603, 2001.

KOKUBO, T., KIM, H.M., KAWASHITA, M.; "Bioactive metals preparation and properties", **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 15, n. 2, pp. 99-107. 2004.

KONG, J.Y., LEE, J.W., KENG, Y.S., KIM, J.D., CHANG, M.W.; BAE, S.K. Utilization of cell bound polysaccharide produced by the marine bacterium *Zoogloea* sp- new biomaterial for metal adsorption and enzyme immobilization. **Journal Marine Biotechnology**. v.6, p. 99-103, 1998.

KONG, J.Y.; BAE, S.K.; LIM, D.J.; KIM, B.J.; rheological properties of polysaccharides produced by *Zoogloea* sp. **Biothechnology letters** 24:202.297-301.1998.

KRISHNAMOORTHY, S.; MAL, D.; SINGH, R. P.; Characterization of graft copolymer based in polyacrylamide and dextran. **Carbohydrate Polymers**, doi:10.1016/j.carbpol.2006.11.017.2007

KUMAR, C. G.; CHANG, C.S.; JOO, H.S.; CHOI, J.W.; KOO, Y.M.; Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34: 673–681, 2004.

KUMAR, N. C.; RAVIKUMAR, M. N. V.; DOMB, A. J.; Biodegradable block copolymers. **Advacend Drug Delivery Reviews**, v.53, p. 23-44, 2001.

LEAL, C. V. Desenvolvimento e Avaliação In Vitro de um Cimento de Fosfato de Cálcio, **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

LIMA, S. V. C.; JUCÁ, N. T.; AGUIAR, J. L. A.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; MELO, F.A. D.; Gel obtido de polímero produzido a partir da síntese do melão da cana-de-açúcar e de outros açúcares, via microrganismo *Zoogloea* sp. **Brazilian Patent** request No. 1704, ded.02-09-2003, Brazil.

LIMA, S.; AGUIAR, J.L. A; PEREIRA, L.A.; MACHADO M.; ANDRADE, R.; LIMA, R.; LIMA, R.; VILAR, F.; A new dressing for hypospadias surgery. **International Brazilian journal of Urology**, v. 32(2), p. 189, June, 2006.

MADLA, S.; METHACANONB, P.; PRASITSILB, M.; KIRTIKARA, K.; Characterization of biocompatible fungi-derived polymers that induce IL-8 production. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, p. 275–280, 2005

MATSUMOTO T.;TATSUMI,D.;AONO;H.;TAMAI;N.; Difference in Rheological Properties of solutions of plant and bacterial cellulose in LiCl/N,N-Dimethylacetamide. **Journal of the society of rheology**, v.31 vol 3 p. 119-130. 2003.

MENDES FILHO, A.A. Síntese e caracterização de hidroxiapatita e compósitos a partir de matéria prima reciclada. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Ouro Preto. Minas Gerais, Brasil, 2006.

MERLE, L.; CHARPENTIER, D.; MOCANU, G.; CHAPELLE, S. Comparison of the distribution pattern of associative carboxymethylcellulose derivatives. **European Polymer Journal**, v.35, p. 1-7, 1999.

MOREIRA, A.S.; SOUZA, A.S.; VENDRUSCOLO, C.T.; Determinação da composição de biopolímero por cromatografia em camada delgada: Metodologia. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4, n° 3, 222-224, Set.-Dez., 1998.

MOUCHENG, W.; ZHENG, R.; JIE, S.; HANCHUANB, D.; Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. **International Immunopharmacology**, v. 5, p.811– 820. 2005.

MÜLLER F. A., MÜLLER L., HOFMANN I., GREIL P., WENZEL, M. M., STAUDENMAIER R. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**. 27 p.3955–3963; 2006.

NÉRIS, M.A. Desenvolvimento e caracterização de gel de biopolímero produzido pela fermentação de melão de cana-de-açúcar pelo microorganismo **Zoogloea sp.** **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)**, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2007.

NETO, J.E.; COELHO, A.R.B.; FALCÃO, S.C. Biomechanical evaluation of cellulose (*Zoogloea sp.*) and expanded polytetrafluoroethylene as implants in the repair of produced abdominal wall defects in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. V.23(2) 2008.

NORTON, L.V.; TENGELL, K, TOPOREK, SS, REUCHERT, W.M.; **Biomaterials**; V.26; 3285. 2005.

OKANO, T.; SHIBAZAK, H.; KUGA, S. Mercerization and acid hydrolysis of bacterial cellulose. **Cellulose**. v. 4 p.75-87. 1997.

OREFFO, R.O.C.; TRIFFIT, J.T. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. **Bone**, August, 25(2):5S-9S. 1999.

PADILHA, F.F.; DELLAGOSTIN, O. A.; VENDRUSCOLO, C. T. Composição química do biopolímero de *Beijerinckia sp 7070* por cromatografia em camada delgada. **Revista Brasileira de Agrociência**, V.4, N° 3, 231-233, Set.-Dez.1998.

PANAYIOTOU C., TSIOPSIAS, C. Preparation of cellulose-nanohydroxyapatite composite scaffolds from ionic liquid solutions. **Carbohydrate Polymers**v.74 99–105; 2008 .

PARK, J.B. **Biomaterials Science and Engineering**, Plenum press/New Yrk and London, 1990.

PATERSON-BEEDLE, M.; KENNEDY, J.F.; MELO, F.A.D.; LLOYD, L.L.; MEDEIROS, V.; A cellulosic exopolysaccharide produced from sugar cane molasses by a *Zoogloea sp.* **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 375-383, 2000.

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

PINTO, E. P.; MOREIRA, A.; VENDRUSCOLO, C.T.; Influence of pH, addition of salts and temperature in the viscosity of biopolymers produced by *Beijerinckia sp.* 7070 and Ur4. **Revista Brasileira De Agrociência**, v. 8, n. 3, p. 247-251, set-dez, 2002.

RAMBLA, M.A O; PRADA, A R.; COOPAT, T.S. CARRACEDO, G.B. Méis. Manual dos derivados da cana-de-açúcar. **Instituto Cubano de Pesquisas dos Derivados da Cana-de-Açúcar**. Cap. 2.4, p. 49-55. 1999.

RANGEL, A.E.O.; AGUIAR, J.L.A.; LIMA, S.V.C.; ARAÚJO, F.C.; VILAR, F.O.; PIRES, J.A.C.; MACHADO, M.R.; CAMPOS, E.G.; A new biomaterial for the tratamento of vesicoureteral reflux: experimental study. **International Brazillian Journal of Urology**, v.32 (2), p. 184, June, 2006.

RATNER, B.D., "A History of Biomaterials". In: Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemos, J.E.(eds), **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**, ed 2. 2004

RESENDE, C.X. Estudo teórico-experimental de duas soluções para testes de bioatividade e revestimento de materiais. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2007.

RISSANE, K.; MANSIKKAMÄKI, P.; LAHTINEN, M. Structural changes of cellulose crystallites induced by mercerisation to different solvents systems: determined by powder X-ray diffraction method. **Cellulose**. 12 233-242. 2005.

SEAL, B.L.; OTERO, T.C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Materials Science. and Engineering.R.** 34:147-230. 2001.

SILVA, B.D. Miringoplastia com membrana de biopolímero e fásia autóloga em *Chinchilla laniger*. **Dissertação (Mestrado em Cirurgia)**. Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2006.

SILVA, D.B. AGUIAR J. L.A.; MARQUES, A. COELHO A R B. ROLIM FILHO E. L. Miringoplastia com enxerto livre de membrana de biopolímero de cana de açúcar e fásia autóloga em *Chinchilla laniger*. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade.Federal de Pernambuco**, v.51 (1), 2006 .

SLETMOEN M.; MAURSTAD G.; SIKORSKI P., PAULSEN B. S., STOKKE, B. T. Characterisation of bacterial polysaccharides: steps towards single molecular studies. **Carbohydrate Research** , 338, p.2489-2475. 2003.

SLETMOEN, M, MAURSTAD,G, STOKKE,BT. Potentials of biotechnology in the study and manufacturing of self-assembled biopolymer complexes and gels. **Food Hydrocolloids**. Doi: 101016/j.foodhyd.2006.12015. 2007.

SOUZA, D. M. de; GARCIA-CRUZ, C. H.. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Seminário de Ciências Agrárias**, 25: 331-340. 2004

SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L.; BRITTBERG, M.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, v.26, n.4, p.419-31. 2005.

TAKAMORI, E.R. Estudo **in vitro** da citotoxicidade de osso bovino misto quimicamente tratado. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo. 2004.

TROYANO, E.; LEE, S.P.; RHAB, C.K.; SINSKEY, A.J.; Presence of acetate and succinate in the exopolysaccharide produced by **Zoogloea Ramigera** 115SLR. **Carbohydrate Polymers**, v. 31, p. 35-40, 1996.

VAN DE VELDE, K.; KIEKENS, P.; Biopolymers: overview of several properties and their applications. **Polymer Testing**, v. 21, p. 433-442, 2002.

VILAR, F.; AGUIAR, J.L.; VILAR, S.; MACHADO, M.; PONTES, F.; LIMA, R.; LUCENA, R.; BARROS, E.G.; Doença de Peyonie: estudo de um novo material com perspectiva de aplicação clínica. **International Brazillian Journal of Urology**, v. 32(2), p. 167, June, 2006.

WILLIAMS, D.F. **Definitions in biomaterials**. Elsevier ed. Amsterdam.1987.

YANG, F., WOLKE, J.G.C., JANSEN, J.A. Biomimetic calcium phosphate coating on electrospun poly (ϵ -caprolactone) scaffolds for bone tissue engineering. **Chemical Engineering Journal**. v.137, p.154–161, 2008

YAMNAKA & WATANABE, K.; Applications of bacterial cellulose. **Cellulosic Polymers, Blends and Composites** p.207-215. 1994.

7. ANEXO

Trabalhos resumidos em anais de congressos Nacionais e Internacionais

1. NÉRIS, M.A.; LUNA, D.M.N.; CAVALCANTI, C.B AGUIAR, J.L.A. ; SANTOS-MAGALHAES,N.S; THERMAL ANALYSIS CHARACTERIZATION PF BIOPOLYMER PRODUCED FROM SUGARCANE MOLASSES BY ZOOGLOEA SP. In: XXXVII Anual Meeting of Sociedade Brasileira de Bioquímica, SBBq ,2008 ÁGUAS DE LINDÓIA-SP p.72
2. CAVALCANTI,C.B.; LUNA,D.M.N., AGUIAR,J.L.A.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; ZETA POTENTIAL EVALUATION OF BIOPOLYMER HYDROGELS. In: XXXVII Anual Meeting of Sociedade Brasileira de Bioquímica, SBBq ,2008 ÁGUAS DE LINDÓIA-SP p.72.
3. CAVALCANTI,C.B.; LUNA,D.M.N.;AGUIAR, J.L.A. ; SANTOS- MAGALHAES N.S; CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA EM BIOPOLÍMERO. XII Congreso de la federación Farmacêutica Sudamericana. 2008. MONTEVIDEO, URUGUAY.
4. CAVALCANTI,C.B.; CAVALCANTI,I.M.F.; MENDONÇA, E.A.M., SANTOS-MAGALHÃES, N.S. CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO β -LAPACHONA E COMPLEXO DE INCLUSÃO β -LAP-2-HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA. XII Congreso de la Federación Farmacêutica Sudamericana. 2008. MONTEVIDEO, URUGUAY.
5. SILVA,E.J.; LUNA, D.M.N.; CAVALCANTI,C.B; AGUIAR,J.L.A.; SANTOS MAGALHÃES,N.S. CHARACTERIZATION OF BIOGEL PRODUCED BY *zoogloea sp.* I Simpósio Nacional em Diagnóstico e Terapêutica Experimental IV Jornada Científica do LIKA.2008. Recife, PE.