

COMPÓSITO MULTICAMADAS DE HIDROXIAPATITA E NANOCELULOSE BACTERIANA

Derce O. S. Recouvreux¹, Carlos R. Rambo¹, Claudimir A. Carminatti¹, Fernanda V. Berti¹, Regina V. Antônio², Luismar M. Porto¹

Grupo de Engenharia Genômica

¹Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

²Departamento de Bioquímica

Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário – CEP 88040-900

Florianópolis, SC

Telefone: +55(48) 3721-9713 – Email: dercer@intelab.ufsc.br

Abstract: A scaffold made of multilayer bacterial cellulose-hydroxyapatite hydrogel composite was synthesized by a biomimetic method. Multilayer bacterial cellulose hydrogel was soaked in solutions of CaCl₂ followed by incubation in Na₂HPO₄. The ratio of Ca:P in the final composite was determined as 1.37, by energy dispersive spectroscopy. The morphology and distribution of hydroxyapatite particles on the multilayer bacterial cellulose hydrogel was evaluated by scanning electron microscopy. It was observed that calcium phosphate was deposited on the surface and homogeneously distributed within the cellulose nanofibers. Scaffold size, internal structure and surface properties are potentially good parameters for bone tissue engineering.

Palavras-chave: celulose bacteriana, multicamadas, hidroxiapatita, engenharia de tecidos, medicina regenerativa.

Introdução

Nanofibras de celulose bacteriana (CB) têm se mostrado um material biológico versátil, com excelentes propriedades para construção de suportes (scaffolds) para a engenharia de tecidos e medicina regenerativa; por outro lado, a hidroxiapatita tem sido utilizada como biomaterial em diversas aplicações biomédicas, devido às suas propriedades de biocompatibilidade e osteoindução.

A CB pertence a uma das classes mais promissoras de biopolímeros, devido às propriedades peculiares únicas, não apresentadas por outros biomateriais. A celulose produzida por bactérias é altamente pura, uniforme, biocompatível – exigência necessária para biomateriais [1] – e possui grande capacidade de retenção de líquidos [2], propriedade importante para aplicações médicas e de engenharia de tecidos [3].

A celulose produzida por bactérias possui a mesma composição química da celulose produzida por plantas, porém com propriedade mecânicas e estruturais diferentes. Comparando com a celulose sintetizada por plantas, a CB possui maior capacidade de reter água, é

mais cristalina, possui maior resistência à tração, maior área de superfície e sua microestrutura é constituída de nanofibras [4].

A CB tem sido industrialmente utilizada em diversas aplicações, desde membranas para aparelhos de áudio de alta qualidade até materiais para a área biomédica, como adjuvante em tratamentos de lesões da pele [5, 6], ou ainda na produção de vasos sanguíneos [7] e suportes para produtos médicos de engenharia de tecidos [8].

A hidroxiapatita (HAp), Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, é o principal mineral constituinte do tecido ósseo. A hidroxiapatita sintética é muito utilizada em tratamentos de recuperação óssea (implantes e próteses) devido às propriedades de biocompatibilidade e osteoindução, promovendo o crescimento do tecido ósseo. A estrutura química da superfície desse material exerce influência significativa para induzir a formação de uma camada de apatita na sua superfície em condições fisiológicas adequadas [9].

A CB tem sido utilizada recentemente como molde para a síntese biomimética de nanocristais de hidroxiapatita [10]. A CB e a HAp quando expostas a ambientes biológicos promovem a adesão, a proliferação, o crescimento e a diferenciação celular [15].

Neste trabalho foram desenvolvidas e caracterizadas novas estruturas a partir de celulose bacteriana multicamadas (CBM) [16] e de partículas de HAp (CBM-HAp), visando à obtenção de um material compósito constituído de uma matriz porosa com propriedades adequadas para ser utilizado como um biomaterial em regeneração de tecidos ósseos.

Materiais e Métodos

A bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, linhagem ATCC 23769, obtida da Coleção de Culturas Tropicais (CCT), gentilmente fornecida pela Fundação André Tosello (Campinas, SP) foi utilizada neste estudo para a produção de CB.

G. hansenii foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 100 ml contendo 20 ml de meio de cultura com a seguinte composição: manitol (25 g·l⁻¹), extrato de

levedura ($5,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) e bactopeptona ($3,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). Os compostos do meio de cultivo foram diluídos em água destilada, o pH foi ajustado para 6,6 com o auxílio de soluções de HCl e NaOH e esterilizados em autoclave a 120°C durante 20 min. Ao meio de cultivo foram adicionados 5% (v/v) de inóculo obtido de uma cultura estoque. Os cultivos foram mantidos em agitador orbital (150 rpm) a 30°C durante 12 dias.

As estruturas gelatinosas formadas foram coletadas e submetidas ao tratamento de purificação (solução de NaOH 0,1M a 90°C) por 20 min e posteriormente lavadas com água destilada para eliminar as bactérias e remover os resíduos de células e compostos contaminantes do meio de cultivo.

A incorporação de HAp foi realizada em amostras de CBM no estado hidratado, ou seja, foi mantida a sua forma de hidratação natural. O método utilizado para incorporação foi de modo similar ao descrito por Hutchens *et al.* (2006)[10].

As amostras no estado hidratado foram incubadas por 24 h, sob agitação (150 rpm) a 30°C , em soluções de CaCl_2 ($11 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) com pH ajustado em 4,83. Subseqüentemente, as amostras foram lavadas com água deionizada e novamente incubadas por mais 24 h, sob as mesmas condições, em solução de Na_2HPO_4 ($8,52 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), com pH ajustado em 8,36. Foram realizados cinco ciclos de incubação. As amostras foram secas em estufa a 60°C até massa constante para a determinação da massa seca.

A microestrutura do compósito CBM-HAp foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Philips, XL-30). Para as observações da microestrutura, amostras secas do compósito foram dispostas sobre um suporte de alumínio e recobertas com ouro. A espectroscopia de energia dispersiva (EDS), acoplada ao MEV, foi utilizada para determinar a razão Ca:P das partículas de HAp.

Resultados

A estrutura de CBM produzida pela bactéria *G. hansenii* é um gel homogêneo, resistente, contendo aproximadamente 99% de água. A Figura 1(a) mostra uma fotografia da estrutura tridimensional de CBM na forma de hidrogel natural. Esta estrutura foi produzida pelo cultivo de *G. hansenii*, em condições agitadas, durante 12 dias. As dimensões da estrutura na forma de hidrogel natural variam de acordo com o volume do frasco utilizado e o volume do meio de cultivo. As dimensões da estrutura mostrada na Figura 1(a) são: eixo maior = 13 cm; eixo menor = 6 cm, altura = 2,5 cm. A Figura 1(b) mostra uma fotografia da estrutura tridimensional de CBM na forma de hidrogel natural, após ter sido submetida ao tratamento para a incorporação de HAp [16].

A morfologia das amostras de CBM e do compósito CBM-HAp foram analisadas através de observações em MEV. A Figura 1(c) mostra uma micrografia do MEV da superfície da estrutura hidrogel tridimensional de CBM. Pode ser observado que o hidrogel CBM é

composto por uma densa e homogênea matriz de longas fibras. A Figura 1(d) mostra uma micrografia do MEV da superfície do compósito CBM-HAp. Conforme pode ser observado, as longas fibras foram recobertas por partículas de HAp.

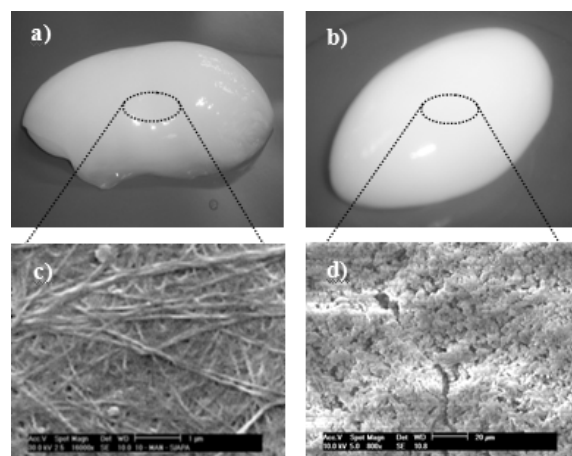


Figura 1: Em (a) fotografia de uma estrutura tridimensional de CBM na forma de hidrogel natural. Em (b) uma fotografia do compósito de CBM-HAp na forma de hidrogel natural. Em (c) micrografia do MEV da superfície de CBM, amplificação 16000 \times . Em (d) micrografia do MEV do compósito CBM-HAp, amplificação 800 \times .

A Figura 2 mostra uma seqüência de micrografias detalhando a estrutura tridimensional multicamadas do compósito CBM-HAp.

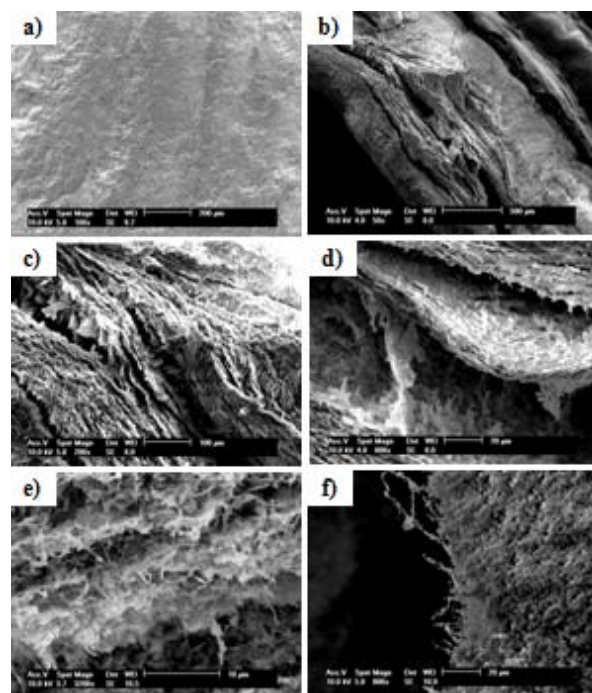


Figura 2: Micrografias do MEV da microestrutura do compósito CBM-HAp. Em (a) micrografia da superfície, amplificação 100 \times . Em (b), (c), (d), (e) e (f)

micrografias da fratura com detalhes das multicamadas com hidroxiapatita depositada nas fibras, ampliações 50×, 200×, 800×, 3200× e 800×.

A Figura 2(a) mostra uma micrografia da superfície do compósito CBM-HAP e as Figuras 2(b), (c), (d), (e) e (f) mostram micrografias da fratura do compósito CBM-HAP, evidenciando os detalhes da microestrutura multicamadas de CB, composta por nanofibras de celulose recobertas por cristais de HAP.

Os resultados da espectroscopia de energia dispersiva (EDS) do compósito CBM-HAP, mostrados na Figura 3, indicam a formação de uma camada rica em Ca e P. Os picos mais intensos correspondem à presença de Ca e P, cuja razão Ca:P foi de 1,37.

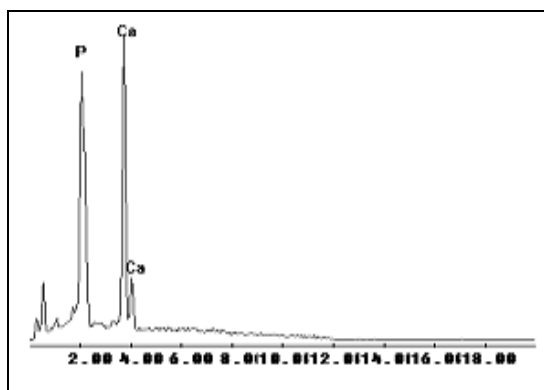


Figura 3: Análise dos compostos químicos da estrutura tridimensional de CB-HAP por espectrometria de energia dispersiva por raios X (EDS).

Discussão

A biomineralização é um processo natural para a formação de ossos e dentes em seres humanos e animais. O método biomimético para recobrimento de materiais com fosfato de cálcio é inspirado por esse processo e consiste em um processo pelo qual uma camada biologicamente ativa da apatita é formada em uma superfície através de imersão em solução artificial supersaturada de cálcio e fosfato [17].

Grupos funcionais da superfície de materiais desempenham um papel decisivo para a modificação das propriedades da superfície [17]. A CB possui hidroxilas livres que podem induzir a deposição de HAP na sua superfície.

Devido às propriedades benéficas da HAP na regeneração de tecidos ósseos muitas pesquisas têm sido conduzidas no sentido de se obter materiais com características que possam aumentar a formação da HAP nos tecidos ósseos [17, 18].

Neste estudo a CBM tridimensional foi utilizada para induzir o crescimento de HAP na sua superfície. Como pode ser observado na Figura 1(a), a estrutura gelatinosa e translúcida tornou-se branca, opaca, e aparentemente mais rígida, após ter sido submetida ao tratamento de incorporação de HAP (Figura 1(b)). A modificação da superfície da microestrutura da CBM, Figura 1(c) pode

ser observada na Figura 1(d), isto é, a estrutura inicialmente constituída de uma rede de fibras foi recoberta por cristais de HAP.

A seqüência de imagens do MEV, mostradas na Figura 2, evidenciam a deposição de HAP nas multicamadas. Os grupos funcionais das microfibras celulósicas da estrutura CBM induziram a deposição de HAP formando um sistema bifásico onde as fibras estão dispersas entre partículas de HAP. Essas partículas possuem uma distribuição homogênea e estreita de tamanhos que variam entre 1 e 2 μm . O sistema hidroxiapatita-fibras celulósicas pode conferir uma maior resistência mecânica ao biocompósito.

A análise EDS mostrou que a razão Ca:P de 1,37 foi menor que a razão estequiométrica característica de hidroxiapatita que é de 1,67. A hidroxiapatita preparada por precipitação de soluções aquosas normalmente resultam em menor razão Ca:P, que pode variar entre 1,33 e 1,67 [19].

A apatita biológica, principal componente inorgânico de tecidos duros humanos, é um fosfato de cálcio não estequiométrico, que permite variações em sua composição e apresentam um déficit de cálcio em relação à hidroxiapatita estequiométrica. A HAP é constituída somente de fosfatos de cálcio termodinamicamente estáveis em soluções aquosas com o pH maior que 4,2. Apatita deficiente de cálcio pode ser usada como precursor do componente inorgânico da apatita biológica [20], uma vez que a formação de HAP envolve uma nucleação inicial com subsequente crescimento de cristais [12]. A presença de Ca e P no compósito CB-HAP analisado por EDS confirmam, portanto, a deposição de hidroxiapatita no polímero celulósico, na forma desejada.

Conclusões

Este estudo mostrou que a estrutura multicamadas de CBM na forma de hidrogel natural é uma estrutura com potencial para a mineralização biomimética de hidroxiapatita na sua superfície. As observações por MEV revelaram que ocorreu distribuição, de forma homogênea, dos cristais de hidroxiapatita na superfície de CBM. O compósito desenvolvido, à luz da caracterização realizada, apresenta-se como um novo material potencial para aplicações de engenharia de tecidos e de regeneração óssea.

Agradecimentos

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro e bolsas concedidas aos pesquisadores envolvidos neste trabalho.

Referências

- [1] Griffith, L.G., Naughton, G. (2002) "Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities". *Science*. v. 295, p. 1009-1014.

- [2] Ross, P., Mayer, R., Benziman, M. (1991) "Cellulose biosynthesis and function in bacteria". *Microbiol. Rev.* v. 55, p. 35-58.
- [3] Palsson, B.O., Bhatia, S.N. (2003) *Tissue Engineering*, Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall
- [4] Brown, R.M., Saxena, I.M., Kudlicka, K. (1996) "Cellulose biosynthesis in higher plants". *Trends Plant Sci.* v. 1, p. 149-156.
- [5] Fontana, J.D., de Souza, A.M., Fontana, C.K., Torriani, I.L., Moreschi, J.C., Gallotti, B.J., de Souza, S.J., Narcisco, G.P., Bichara, J.A., Farah, L.F. (1990) "Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute". *Applied biochemistry and biotechnology.* v. 24-25, p. 253-264.
- [6] Siqueira, J.J.P., Moreschi, J.C. (2000) "Membranas de Celulose Porosas Desidratadas para Curativos em Úlceras, Escoriações e Queimaduras". *Cirurgia Vascular & Angiologia* v. 16, p. 179.
- [7] Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., Marsch, S. (2001) "Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery". *Prog. Polym. Sci.* v. 26, p. 1561-1603.
- [8] Svensson, A., Nicklasson, E., Harrah, T., Panilaitis, B., Kaplan, D.L., Brittberg, M., Gatenholm, P. (2005) "Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage". *Biomaterials.* v. 26, p. 419-431.
- [9] Hartgerink, J.D., Beniash, E., Stupp, S.I. (2001) "Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers". *Science.* v. 294, p. 1684-1688.
- [10] Hutchens, S.A., Benson, R.S., Evans, B.R., O'Neill, H.M., Rawn, C.J. (2006) "Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel". *Biomaterials.* v. 27, p. 4661-4670.
- [11] Ekholm, E., Tommila, M., Forsback, A.P., Martson, M., Holmbom, J., Aaritalo, V., Finnberg, C., Kuusilehto, A., Salonen, J., Yli-Urpo, A., Penttinen, R. (2005) "Hydroxyapatite coating of cellulose sponge does not improve its osteogenic potency in rat bone". *Acta biomaterialia.* v. 1, p. 535-544.
- [12] Hong, L., Wang, Y.L., Jia, S.R., Huang, Y., Gao, C., Wan, Y.Z. (2006) "Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route". *Mater Lett.* v. 60, p. 1710-1713.
- [13] Wan, Y.Z., Hong, L., Jia, S.R., Huang, Y., Zhu, Y., Wang, Y.L., Jiang, H.J. (2006) "Synthesis and characterization of hydroxyapatite-bacterial cellulose nanocomposites". *Compos. Sci. Technol.* v. 66, p. 1825-1832.
- [14] Wan, Y.Z., Huang, Y., Yuan, C.D., S. Ramanc, Zhub, Y., Jiang, H.J., Hea, F., Gao, C. (2007) "Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications". *Mater. Sci. Eng.* v. 27, p. 855-864
- [15] Fricain, J.C., Granja, P.L., Barbosa, M.A., de Jeso, B., Barthe, N., Baquey, C. (2002) "Cellulose phosphates as biomaterials. In vivo biocompatibility studies". *Biomaterials.* v. 23, p. 971-980.
- [16] Porto, L.M., Recouvreux, D.O.S., Antônio, R.V., Rambo, C.R., Carminatti, C.A., Costa, C.M. (2008) "Corpos Tridimensionais de Celulose Bacteriana, Processo de Produção e Uso dos Mesmos". *Depósito de Pedido de Patente - INPI número 0000220803758518.*
- [17] Liu, Q., Ding, J., Mante, F.K., Wunder, S.L., Baran, G.R. (2002) "The role of surface functional groups in calcium phosphate nucleation on titanium foil: a self-assembled monolayer technique". *Biomaterials.* v. 23, p. 3103-3111.
- [18] Tanahashi, M., Matsuda, T. (1997) "Surface functional group dependence on apatite formation on self-assembled monolayers in a simulated body fluid". *J Biomed Mater Res.* v. 34, p. 305-315.
- [19] Mortier, A., Lemaitre, J., Rodrique, L., Rouxhet, P.G. (1989) "Synthesis and Thermal-Behavior of Well-Crystallized Calcium-Deficient Phosphate Apatite". *J. Solid State Chem.* v. 78, p. 215-219.
- [20] Vallet-Regi, M., Rodriguez-Lorenzo, L.M., Salinas, A.J. (1997) "Synthesis and characterisation of calcium deficient apatite". *Solid State Ionics.* v. 101-103, p. 1279-1285.