



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

TAIS DOS SANTOS ALMEIDA

**SCAFFOLDS DE BIOVIDROS 58S PREPARADOS PELA ROTA SOL-GEL E
CONSTRUÍDOS A PARTIR DE MICROFIBRAS DE CELULOSE ORGANIZADAS**

**CAMPINAS
2024**

TAIS DOS SANTOS ALMEIDA

**SCAFFOLDS DE BIOVIDRO 58S PREPARADOS PELA ROTA SOL-GEL E
CONSTRUÍDOS A PARTIR DE MICROFIBRAS DE CELULOSE ORGANIZADAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Química na área de Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran

O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Tais dos Santos Almeida e orientada pelo Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran.

**CAMPINAS
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

Al64s Almeida, Taís dos Santos, 1994-
Scaffolds de biovidro 58S preparados pela rota sol-gel e construídos a partir de microfibras de celulose organizadas / Taís dos Santos Almeida. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Celso Aparecido Bertran.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Celulose. 2. Scaffolds. 3. Biovidro 58S. I. Bertran, Celso Aparecido, 1951-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: 58S bioglass scaffolds prepared by sol-gel routh the constructed from organized cellulose microfibers

Palavras-chave em inglês:

Cellulose

Scaffolds

Bioglass 58S

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestra em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora:

Celso Aparecido Bertran [Orientador]

Italo Odone Mazali

Rubia Figueredo Gouveia

Data de defesa: 23-04-2024

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-1688-2090>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5997431444797867>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran (Orientador)

Prof. Dr. Italo Odone Mazali (IQ-UNICAMP)

Profa. Dr^a. Rubia Figueredo Gouveia (LNNano-CNPEM)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **TAIS DOS SANTOS ALMEIDA**, aprovada pela Comissão Julgadora em 23 de abril de 2024.

A ciência e a vida cotidiana não podem e não devem ser separadas.

(Rosalind Franklin)

Dedico esse trabalho aos meus pais, Dirlene e Aurelito, e meus irmãos, Maiana, Rodrigo, Ely e Elisabete.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradeço a Deus que sempre esteve ao meu lado e me sustentou nos momentos de saudade e angústia, não me deixando desistir!

À minha família por todo apoio e amparo. Especialmente aos meus pais, Dirlene Moreira dos Santos e Aurelito Souza de Almeida, por estarem junto a mim nesta jornada. Aos meus tios e tias. As minhas avós, Maria Regina Souza de Almeida e Esmaelita Luiza Moreira, por me amarem e orarem pela minha vida mesmo de longe. Aos meus irmãos, Maiana Keith Molinari, Rodrigo dos Santos Almeida, Ely dos Santos Almeida e Elisabete dos Santos Almeida por me dar forças, acreditarem em meu potencial, aguentar todos os meus choros e surtos momentâneos e nunca desistirem de mim.

Aos meus sobrinhos Sophia Molinari Miguel e Arthur Kauã Almeida Carvalho, por me inspirarem a ser uma profissional competente.

Ao meu namorado e companheiro, Bruno Alexandre Freire, por sempre me incentivar, ajudar e apoiar. E meus sogros, Maria Conceição Freire e João Wanderley Freire, por acreditarem no meu potencial e me receber de braços abertos em Campinas.

Aos meus amigos de Salvador por não desistirem de nossa amizade, os amigos que fiz na UFF e se tornaram essenciais na minha vida acadêmica e pessoal e aos amigos que fiz na UNICAMP, especialmente a Thalita Mydori por ser uma grande amiga e companheira. Também ao Bruno Almeida e Amanda Almeida pela parceria diária nos laboratórios.

Aos professores que encontrei pelo caminho e que contribuíram não só para a minha formação, mas para a minha admiração e amor pela ciência. Principalmente ao Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran por ser o melhor professor e orientador que eu poderia ter durante o mestrado, pela paciência e por me inspirar todos os dias a ser uma pessoa justa, comprometida e responsável. E também, agradeço a todos profissionais de educação que fizeram do meu ensino público um ensino de qualidade. Agradeço, imensamente, a todos que de alguma forma contribuíram durante a elaboração desse trabalho e a minha formação de Mestra. Principalmente, a UNICAMP, ao Instituto de Química, CPG e PROEX pelo programa de excelência e dedicação crescente.

Agradeço a CAPES pelo incentivo e apoio financeiro. Sem ele o meu trabalho durante a pós-graduação não seria possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – 88887.644249/2021-00 001.

RESUMO

Biovidros representam uma classe de biomateriais muito promissora para a reparação de danos do tecido ósseo, devido à sua biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade. Eles podem ser sintetizados por dois métodos: fusão com resfriamento rápido e por Sol-Gel. A rota Sol-Gel permite preparar estruturas porosas denominadas "*Scaffolds*", as quais apresentam poros interligados e com dimensões adequadas para invasão celular e permeação de fluidos corpóreos, processos decisivos para a rápida regeneração óssea. Neste projeto microfibras de celulose foram preparadas a partir de papel filtro e funcionalizadas com grupo fosfato. As dispersões dessas microfibras foram usadas para a preparação de *Scaffolds* de biovidro 58S (58%SiO₂, 33%CaO, 9%P₂O₅, w/w %). Dispersões de microfibras funcionalizadas com grupos fosfatos fixam íons cálcio e adsorvem Sílica de Stöber. Essas Dispersões se organizaram em estruturas porosas denominadas de "Castelo de Cartas", quando submetidas a condições controladas de centrifugação, congelamento e liofilização. Estas estruturas porosas, contendo todos os elementos que compõem o biovidro 58S constitui um "*Template*" para a construção de *Scaffolds* do biovidro. A calcinação dos *Templates* a temperaturas entre 1100 e 1200°C, por um período de 1 a 2 horas, queimou a celulose, consolidando e sintetizando as partículas de biovidro e dando origem aos *Scaffolds*. Os *Scaffolds* caracterizados por MEV, DRX, FTIR e Fluorescência de raios X apresentaram após calcinação a 1100°C cristalinidade reduzida e estrutura lamelar com espaçamento entre as lamelas da ordem de 50 a 100 µm.

ABSTRACT

Bioglasses represent a very promising class of biomaterials for repairing bone tissue damage, due to their biocompatibility, bioactivity, and osteoconductivity. They can be synthesized by two methods: fusion with rapid cooling and by Sol-Gel. The Sol-Gel route allows the preparation of porous structures called "*Scaffolds*", which have interconnected pores with adequate dimensions for cell invasion and permeation of body fluids, decisive processes for rapid bone regeneration. In this project, cellulose microfibers were prepared from filter paper and functionalized with a phosphate group. Dispersions of these microfibers were used to prepare 58S bioglass *Scaffolds* (58%SiO₂, 33%CaO, 9%P₂O₅, w/w %). Dispersions of microfibers functionalized with phosphate groups fix calcium ions and adsorb Stöber silica. These Dispersions were organized into porous structures called "Castle of Cards" when subjected to controlled conditions of centrifugation, freezing and freeze-drying. These porous structures, containing all the elements that makeup 58S bioglass, constitute a "*Template*" for the construction of bioglass scaffolds. Calcination of the *Templates* at temperatures between 1100 and 1200°C, for a period of 1 to 2 hours, burned the cellulose, consolidating and synthesizing the bioglass particles and giving rise to the *Scaffolds*. The *Scaffolds* were characterized by SEM, FTIR, XDR and X-ray Fluorescence presented reduced crystallinity and lamellar structure with spacing between the lamellae in the order of 50 to 100 µm after calcination at 1100°C.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo proposto por Hench representando as reações na interface entre o biovidro 45S5 e o fluido corpóreo [11].....	23
Figura 2: Representação das transformações químicas na interface entre os biovidros e os fluidos corpóreos. Adaptado de Souza M.T. [12].....	24
Figura 3: Processo de obtenção das microfibras de celulose a partir das fibras de diversos vegetais [32].....	26
Figura 4: Procedimento para a síntese das microfibras de celulose por hidrólise com ácido fosfórico a partir do papel de filtro sem cinzas.....	31
Figura 5: Fotos das etapas da síntese das microfibras. A) Papel whatman com água deionizada após ser triturado com auxílio de um mixer; B) Adição lenta de ácido fosfórico a dispersão de papel imersa em banho de gelo; C) Aquecimento em banho termostato; D) Dispersão após etapa de aquecimento em banho Lauda; E) Microfibras de celulose após lavagens e centrifugações.....	32
Figura 6: Procedimento para funcionalização das microfibras de celulose com ácido metafosfórico em DMF e ureia.....	33
Figura 7: Proposta de reação de modificação de celulose com grupos fosfatos a partir da reação com ácido metafosfórico em DMF e ureia [50].....	34
Figura 8: Processo para síntese de sílica as P-C _μ F+Ca ²⁺ dispersas em CTAB 0,015 mol.L ⁻¹ [OBJ].....	36
Figura 9: Imagens durante o processo de reação de hidrólise da sílica com o uso de TEOS. A) Início da hidrólise; B) Hidrólise após 20h.....	37
Figura 10: Sistema Dip Coating utilizado para o congelamento lento através do controle de velocidade em cm.min ⁻¹	38

Figura 11: Espectro RMN para ^{31}P da microfibras de celulose liofilizada e antes da funcionalização.....	42
Figura 12: Distribuição de tamanho para a dispersão das microfibras de celulose, C_μF , obtidas pela hidrólise do papel Whatman com ácido fosfórico 85%.....	42
Figura 13: Micrografia das microfibras de celulose (C_μF) após liofilização e dispersas em água deionizada.....	43
Figura 14: Difratoograma das microfibras de celulose obtidas por hidrólise ácida com ácido fosfórico 98% PA.....	44
Figura 15: Espectro RMN para ^{31}P do material funcionalizado com grupos fosfato.....	45
Figura 16: Espectro no Infravermelho da C_μF em vermelho e da $\text{P-C}_\mu\text{F}$ em preto.....	46
Figura 17: Reação dos grupos fosfatos com íons cálcio.....	47
Figura 18: TG e DTG das microfibras de celulose fosforiladas, adicionadas íons Ca^{2+} e liofilizadas.....	49
Figura 19: Reação esquemática para obtenção de sílica catalisada por base. Todas as etapas ocorrem simultaneamente.....	52
Figura 20: Distribuição de tamanho para a dispersão das $\text{P-C}_\mu\text{F}+\text{Ca}^{2+}$ /Sílica obtidas após reação de hidrólise do TEOS em pH 10.....	53
Figura 21: <i>Template</i> obtido a partir da dispersão em de $\text{P-C}_\mu\text{F}+\text{Ca}^{2+}$ /sílica com CTAB usando como estratégia, centrifugação e congelamento lento, usando o sistema Dip Coating, seguido de liofilização.....	54
Figura 22: Micrografias do <i>Template</i> após o processo de organização através da centrifugação controlada e congelamento seguido de liofilização. A) e B) Correspondem as micrografias do <i>Template</i> com aumento de 500 e 100 μm , respectivamente.....	54

Figura 23: Difratoograma para o <i>Template</i> obtido de acordo com o item 4 deste trabalho.....	55
Figura 24: Representação esquemática da rede da sílica do biovidro que representam o precursor do vidro bioativo obtido por sol-gel, após calcinação.....	59
Figura 25: Micrografias dos <i>Scaffolds</i> em 1100 e 1200°C em diferentes aumentos. A) e B) Correspondem as micrografias do <i>Scaffold</i> calcinados a 1200°C. C) e D) Correspondem as micrografias do <i>Scaffold</i> calcinados a 110.....	62
Figura 26: BG-1100 calcinado à 1100°C. Visivelmente nota-se a ‘diminuição’ de tamanho em comparação a Figura 21 que é o <i>Template</i> que deu origem ao biovidro.....	63
Figura 27: Difratoograma de raios-x para o <i>Scaffold</i> BG-1100.....	64
Figura 28: Espectro no Infravermelho do módulo de Transmitância para BG-1100 em preto. Para comparação é mostrado também, em vermelho, o espectro obtido para o <i>Template</i> que deu origem ao biovidro.....	65
Figura 29: Micrografias do <i>Template</i> e <i>Scaffolds</i> BG-1100 (R2) em diferentes aumentos. A) e B) Correspondem as micrografias do <i>Template</i> . C) e D) Correspondem às micrografias do <i>Scaffold</i>	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados da Titulação Indireta de Complexação com EDTA 0,02 mol.L ⁻¹ obtidos após a reação das P- C μ F com solução de Ca ²⁺ 0,02 mol.L ⁻¹	48
Tabela 2: Resultados da Análise de TGA para P- C μ F+Ca ²⁺	49
Tabela 3: Potencial zeta das dispersões de C μ F, P- C μ F, P-C μ F+Ca ²⁺ em água e da dispersão de P-C μ F+Ca ²⁺ +CTAB em solução de CTAB 0,015 mol.L ⁻¹	51
Tabela 4: Composição do <i>Template</i> , expressa como P ₂ O ₅ , CaO e SiO ₂ , em % m/m dos componentes do <i>Template</i> , obtido por FRX após liofilização.....	56
Tabela 5: Temperaturas, tempos e rampas de aquecimento utilizados na calcinação dos <i>Templates</i>	60
Tabela 6: Resultados das porcentagens em massa (% m/m) dos componentes do biovidro que forma o <i>Scaffold</i> BG-1100 expressos como P ₂ O ₅ , CaO e SiO ₂ , obtidos por FRX.....	66
Tabela 7: Composição Química em % m/m determinada por FRX para o <i>Template</i> e <i>Scaffold</i> BG-1100 obtidos pela rota R1. Média para 2 pontos distintos na amostra.....	69
Tabela 8: Composição Química em porcentagem de massa (% m/m) determinada por FRX para o BG-1100 obtidos com adição de íons cálcio pela rota R2, média de 2 pontos distintos na amostra.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATR-IR: Espectroscopia no infravermelho acoplada com acessório de refletância total atenuada

C μ F: Microfibras de celulose, do inglês *Cellulose microfibers*

CTAB: brometo de hexadeciltrimetil amônio, do inglês *hexadecyltrimethylammonium bromide*

DLS: Espalhamento Dinâmico de Luz, do inglês *Dynamic Light Scattering*

DRX: Difração de Raios X

FRX: Fluorescência de Raios X

FTIR: Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês *Fourier Transform with Infrared*

HCA: Hidroxiapatita Carbonatada

MAS-NMR: Ressonância Nuclear Magnética de estado sólido, do inglês *Magic angle spinning Nuclear Magnetic Resonance*

P- C μ F: Microfibras de celulose fosforiladas, do inglês *Phosphorylated cellulose microfibers*

P- C μ F+Ca²⁺: Microfibras de celulose fosforiladas com adição de íons cálcio

P- C μ F+Ca²⁺+CTAB: Microfibras de celulose fosforiladas com adição de íons cálcio e dispersas em solução de CTAB

P- C μ F+Ca²⁺/sílica: Dispersão de P- C μ F+Ca²⁺+ TEOS em solução de CTAB.

SEM: Microscopia Eletrônica de Varredura, do inglês *Scanning Electron Microscopy*

TEOS: Tetraetilortosilicato

TGA: Análise Termogravimétrica, do inglês *Thermogravimetric Analysis*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Vidros bioativos.....	21
1.2. Microfibras de celulose (C _μ f) e microfibras de celulose fosforiladas (P-C _μ F).....	25
1.3. Fixação de íons cálcio e sílica pelas microfibras fosforiladas de celulose.....	27
1.4. Formação dos <i>templates</i> de microfibras fosforiladas após fixação de íons cálcio e adsorção de sílica.....	27
1.5. Calcinação dos <i>Templates</i> para obter os <i>Scaffolds</i> de biovidro.....	28
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivo Geral.....	29
2.1.1. Objetivos Específicos.....	29
CAPÍTULO I: SÍNTESE DAS MICROFIBRAS DE CELULOSE, FOSFORILAÇÃO E ADIÇÃO DE ÍONS CÁLCIO E SÍLICA PARA CONSTRUÇÃO DOS <i>TEMPLATES</i> ..	30
3. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS MICROFIBRAS DE CELULOSE FUNCIONALIZADAS COM GRUPOS FOSFATOS E ADIÇÃO DE ÍONS CÁLCIO..	31
3.1. Procedimento experimental para obtenção das microfibras de celulose.....	31
3.1.1. Materiais.....	31
3.1.2. Síntese da dispersão de microfibras de celulose (C _μ F) por hidrólise com ácido fosfórico a partir de papel de filtro Whatman.....	31
3.2. Procedimento experimental para funcionalização das C _μ F com grupos fosfatos.....	33
3.2.1. Materiais.....	33
3.2.2. Síntese das microfibras de celulose fosforiladas (P-C _μ F).....	33
3.3. Determinação do grau de fosforilação por titulação indireta de	

complexação com íons cálcio.....	34
3.4. Determinação do grau de fosforilação por análise térmica, TGA.....	35
3.5. Preparação dos <i>Templates</i> pela organização das microfibras.....	35
3.5.1. Materiais.....	36
3.5.2. Determinação do Potencial zeta das microfibras de celulose.....	36
3.5.3. Preparação das Dispersões de Microfibras fosforiladas contendo cálcio e sílica.....	36
3.6. Preparação dos <i>Templates</i> por congelamento e liofilização das dispersões preparadas no item 3.5.3.....	37
4. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	38
4.1. Determinação da distribuição de tamanho das C μ F por espalhamento de luz estático usando Mastersize 2000.....	38
4.2. Determinação de cristalinidade das C μ F e <i>Template</i> por difração de raio-X.....	39
4.3. Ressonância magnética nuclear (NMR) de ^{31}P das C μ F e P-C μ F.....	39
4.4. Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das C μ F e P-C μ F.....	39
4.5. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) das C μ F, P-C μ F e <i>Template</i>	39
4.6. Determinação do grau de fosforilação por titulação indireta das amostras de P-C μ F com solução de Ca^{2+}	40
4.7. Determinação do grau de fosforilação por TGA das P- C μ F+ Ca^{2+}	41
4.8. Determinação dos potenciais zeta das dispersões de: C μ F, P-C μ F, P-C μ F+ Ca^{2+} e P-C μ F+ Ca^{2+}	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
5.1. Obtenção e caracterização das C μ F por distribuição de tamanhos por espalhamento de luz estático, ressonância magnética nuclear e microscopia eletrônica de varredura.....	41
5.1.1. Determinação da cristalinidade das C μ F.....	43
5.2. Obtenção e caracterização das P-C μ F por MAS-NMR ^{31}P e FTIR.....	44
5.3. Determinação do grau de fosforilação das P-C μ F por titulação indireta	

com íons cálcio (Ca ²⁺) e análise termogravimétrica, TGA.....	47
5.4. Preparação da dispersão P-C _μ F+Ca ²⁺ /sílica com uso de CTAB para preparação dos <i>Templates</i>	50
5.5. Adsorção de sílica com uso de CTAB.....	52
5.6. Formação e caracterização do <i>Template</i>	54
5.6.1. Composição Química do <i>Template</i>	55
CAPÍTULO II - SÍNTESE DE SCAFFOLDS DE BIOVIDROS UTILIZANDO OS TEMPLATES.....	57
6. SCAFFOLD DE BIOVIDRO.....	58
6.1. Procedimento experimental para obtenção do <i>Scaffold</i> de biovidro por calcinação.....	59
7. CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS DE BIOVIDRO.....	61
7.1. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) dos <i>Scaffolds</i>	61
7.2. Difração de raio-X dos <i>Scaffold</i>	61
7.3. Fluorescências de raios-X.....	61
7.4. Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos <i>Scaffolds</i> de biovidro.....	61
8. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
8.1. Estrutura dos <i>Scaffolds</i> de biovidro.....	62
8.2. Difração de raios-X do <i>Scaffold</i> de biovidro.....	64
8.3. Composição química do <i>Scaffold</i> BG-1100.....	64
9. AJUSTE DA COMPOSIÇÃO DOS SCAFFOLDS DE BIOVIDRO.....	67
9.1. Metodologias da adição de íons cálcio e sílica à dispersão.....	67
10. CARATERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS DE BIOVIDRO APÓS A CORREÇÃO DE COMPOSIÇÃO.....	68
10.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).....	68
10.2. Fluorescências de raios-X.....	68
11. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
11.1. Composição química dos <i>Scaffolds</i> de biovidro BG1100 preparados pela rota R1 e R2.....	69

11.2. Estrutura dos <i>Scaffolds</i> de biovidro 58S com adição de íons cálcio...	71
CONCLUSÕES.....	73
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	73
REFERÊNCIAS.....	74
APÊNDICE A - HISTÓRICO ACADÊMICO.....	84

PREFÁCIO

Para melhor leitura e entendimento, a Dissertação de Mestrado foi dividida em dois capítulos.

No Capítulo I é apresentado o estudo da síntese das microfibras de celulose, fosforilação e adição de íons cálcio a estas microfibras e a formação da estrutura porosa que será utilizada como *Template* para a formação do *Scaffold* de biovidro.

No Capítulo II, é apresentado o estudo para produção de *Scaffolds* de vidros bioativos com composição similar à do 58S, pela adição de íons cálcio e sílica à estrutura porosa formada pelas microfibras fosforiladas, seguida da calcinação por períodos de tempo e temperatura controlados.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vidros bioativos

Os danos ao tecido ósseo, conseqüentemente ao esqueleto, são problemas crescentes na saúde pública por estarem relacionados a acidentes, infecções e câncer [1]. Para o reparo destes males, um grande número de casos exige o emprego de próteses e de biomateriais que suportem e/ou estimulem o crescimento do “osso novo”. Para que o dano ao tecido ósseo seja reparado é necessário que o “osso novo” cresça e o preencha, restabelecendo a funcionalidade do osso danificado. Para que este processo ocorra da forma mais eficiente é desejável que o biomaterial que irá estimulá-lo, permita que as células e substâncias nele envolvidas, entrem pelo biomaterial presente no dano.

Entre os biomateriais utilizados para suportar e estimular o crescimento do tecido ósseo, os biovidros merecem destaque pela sua bioatividade. A excepcional bioatividade apresentada pelos biovidros está relacionada à formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) na interface entre o biovidro e o tecido ósseo em crescimento, consequência da composição do biovidro, da ação de células como os osteoblastos e de substâncias como proteínas e íons presentes no fluido corpóreo [2,3].

O biovidro Bioglass®45S5, um vidro quaternário com composição molar igual a 24,4% de Na₂O, 46,1% de SiO₂, 26,9% de CaO e 2,6% de P₂O₅, descoberto por Larry Hench, é considerado até hoje o “Golden Standard” para esta classe de biomateriais. Além dos biovidros quaternários, existem vidros terciários como o denominado 58S (58% SiO₂, 33% CaO, 9%P₂O₅, w/w%) que apresentam bioatividade comparável à do BG45S5 [4,5,6].

O biovidro 58S (58% SiO₂, 33% CaO, 9%P₂O₅, w/w%), estudado nesse trabalho, também tem sido considerado promissor nos estudos de reparação óssea por apresentar uma excepcional bioatividade através da formação de uma camada heterogênea de Hidroxiapatita Carbonatada (HCA), na qual a reatividade da superfície vítrea através da liberação de íons formados por espécies presentes na composição deste biovidro, como Si, Ca e P, promovendo uma rápida formação óssea [7,8,9].

As reações que ocorrem na superfície do vidro bioativo, responsáveis pela característica bioativa do material, têm sido representadas por uma sequência de cinco etapas. Essas etapas foram propostas para o Bioglass 45S5 por Larry Hench, mas a sua aplicação inclui toda classe de vidros silicatos, como o biovidro 58S. As cinco etapas de reação são mostradas na Figura 1 [3,10]:

Estágios	Reação
I. Troca Iônica	<p>Troca iônica rápida ,entre os íons Na^+ e/ou Ca^{2+} presentes na rede vítrea com os íons H_3O^+ do meio biológico, aumentando o pH do meio e favorecendo a formação de grupos silânicos (Si-OH) na interface biovidro/meio aquoso:</p> <p>$\text{Si} - \text{O}^- \text{Na}^+_{(\text{vidro})} + \text{H}_3\text{O}^+_{(\text{solução})} \rightarrow \text{SiOH}^+ + \text{Na}^+_{(\text{aq})} + \text{OH}^-$ (Equação 1)</p> <p>$(\text{Si} - \text{O}^-)_2 \text{Ca}^{2+}_{(\text{vidro})} + \text{H}_3\text{O}^+_{(\text{solução})} \rightarrow \text{SiOH}^+ + \text{Ca}^{2+}_{(\text{aq})} + \text{OH}^-$ (Equação 2)</p>
II. Hidrólise	<p>O pH elevado do meio resulta no ataque dos íons OH^- sobre as ligações siloxano da rede vítrea do biovidro e resulta na formação de mais grupos silânicos na interface biovidro/solução:</p> <p>$2(\text{Si}-\text{O}-\text{Si})_{(\text{vidro})} + 2(\text{OH}^-)_{(\text{solução})} \rightarrow 2(\text{Si}-\text{OH})$ (Equação 3)</p>
III. Policondensação	<p>Policondensação dos grupos silânicos na superfície do biovidro e conseqüente repolimerização formando uma camada na interface rica em sílica gel.</p> <p>$\dots \text{O}-\text{Si}-\text{OH} + \text{HO}-\text{Si}-\text{O} \dots \rightarrow \dots \text{O}-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{O} + \text{H}_2\text{O}$</p>
IV. Formação da apatita	<p>Migração das espécies Ca^{2+} e PO_4^{3-} para a interface sílica4 gel /fluido corpóreo e formação de um filme amorfo rico em $\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5$ sobre a camada rica em sílica-gel;</p>
V. Cristalização da Apatita	<p>Incorporação dos íons hidróxidos e carbonatos presentes no fluido corpóreo e a cristalização do filme amorfo rico em $\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5$ formando uma camada heterogênea de hidroxiapatita carbonatada solúvel na superfície.</p>

Figura 1: Mecanismo proposto por Hench representando as reações na interface entre o biovidro45S5 e o fluido corpóreo [11].

Após as 5 etapas descritas na Figura 1 entre a superfície do vidro bioativo e o fluido corpóreo ativam-se os processos biológicos que resultam na formação da ligação do biovidro com o tecido ósseo. Esses processos envolvem a adsorção de

proteínas que atuam como sinalizadores para adesão de células mesenquimais não diferenciadas. Essas células se diferenciam, proliferam e produzem uma matriz extracelular – componente indispensável no processo de biomineralização [6,7].

Na Figura 2 está representada, de forma esquemática, os processos químicos que transformam a superfície do biovidro em um ambiente propício para as células proliferarem.

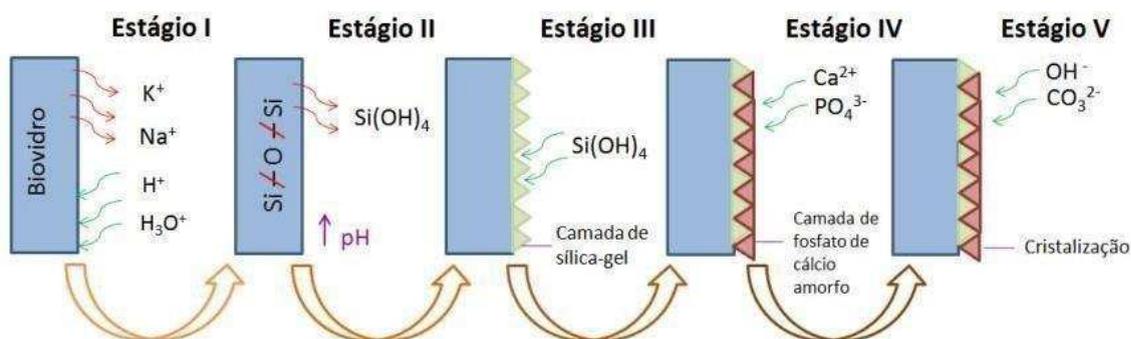


Figura 2: Representação das transformações químicas na interface entre os biovidros e os fluidos corpóreos. Adaptado de Souza M.T. (2015) [12].

Os biovidros na forma de pastas, espumas ou “blocos porosos” têm sido utilizados na área médica para preenchimento ou reconstrução de cavidades que são causadas por fraturas, infecções e câncer [13,14].

Biovidros na forma de “blocos porosos”, denominados *Scaffolds*, são adequados para reconstrução óssea por serem formados por uma estrutura porosa com poros interconectados, que permite a permeação dos fluidos corpóreos e células estimulando o crescimento do tecido [15,16].

Um método adequado para construção dos *Scaffolds* é o Método sol-gel associado a um agente porogênico. Este método pode ser realizado a baixas temperaturas, formar poros com tamanho controlado e interconectados, o que favorece a alta bioatividade [11,12,13].

Os *Scaffolds* produzidos via sol-gel além de apresentarem alta bioatividade, apresentam maior velocidade de formação de HCA quando comparado aos produzidos pelo método de fusão e resfriamento.

Neste trabalho, *Scaffolds* de biovidro 58S foram obtidos através da construção de *Templates* formados por microfibras de celulose fosforiladas contendo cálcio e com sílica adsorvida.

Os *Templates* foram obtidos a partir da organização das microfibras fosforiladas através de centrifugação controlada, congelamento lento em nitrogênio

líquido e seguido de liofilização. Os *Templates* foram calcinados resultando em *Scaffolds* de biovidro com cristalinidade reduzida.

Para melhor compreensão, apresentamos nos tópicos seguintes da Introdução, uma breve caracterização e fundamentos dos métodos utilizados no desenvolvimento do trabalho. Na discussão dos resultados que compõem o Capítulo I e Capítulo II estes tópicos serão detalhados.

1.2. Microfibras de celulose (C μ f) e microfibras de celulose fosforiladas (P-C μ F)

A celulose é um material polimérico bastante abundante na Terra e pode ser processada para uma ampla gama de aplicações, incluindo engenharia, papel, materiais energéticos e biomédica [17,18,19,20]. A celulose possui propriedades interessantes que chamam atenção para essas diversas áreas, como: não toxicidade, resistência mecânica significativa, biocompatibilidade e baixo custo.

A estrutura da celulose é bastante estável, composta por unidades de glicose ligadas por ligações de 1,4- β -glicosídica e cada unidade possui um grupo hidroxila primário e dois secundários, formada por cadeias que se organizam em uma fase cristalina e uma fase amorfa [21,22] e essas características dão a celulose funcionalidades químicas e propriedades físicas e mecânicas [23].

A partir da hidrólise ácida da celulose pode-se isolar estruturas como os nanocristais de celulose (CNC), microcristais de celulose (C μ C) e microfibras de celulose (C μ F) [23,24,25].

As microfibras de celulose possuem diâmetro variando de 2 a 50 μ m e comprimento de 10-4000 μ m [26,27] e podem ser obtidas pela reação de hidrólise ácida, seja com ácido fosfórico, ácido sulfúrico ou ácido clorídrico [28,29,30]. Na hidrólise ácida a parte amorfa da celulose pode ser dissolvida restando a parte cristalina [31].

A Figura 3 mostra, de forma simplificada, como ocorre o processo de obtenção das microfibras de celulose, e também nanocristais de celulose e fibrilas de celulose, a partir de fibras vegetais.

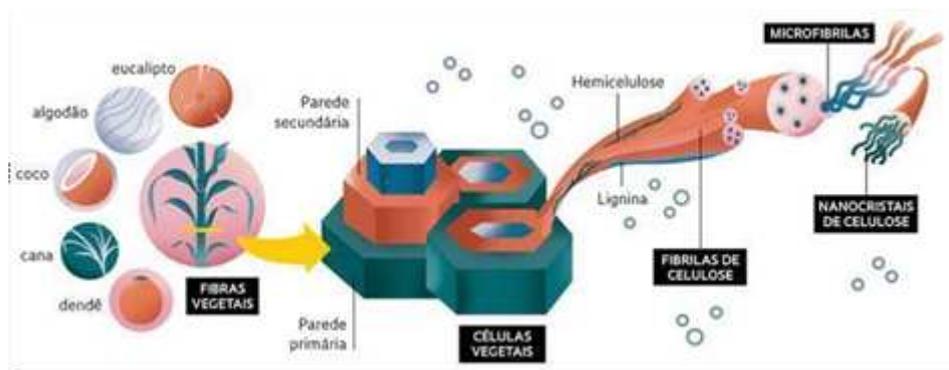


Figura 3: Processo de obtenção das microfibras de celulose a partir das fibras de diversos vegetais (CAMPOS, 2017) [32].

Neste trabalho as C μ F foram utilizadas como *Templates*, pois podem ser organizadas utilizando técnicas específicas como: centrifugação controlada e congelamento lento seguido de liofilização.

As microfibras de celulose (C μ F) têm se mostrado uma ferramenta estratégica para o desenvolvimento de materiais biocompatíveis [33,34], como será explorado neste trabalho para formação de *Scaffold* de biovidros.

Outro aspecto importante dos materiais poliméricos, como as microfibras a base de celulose, é a facilidade de modificar sua estrutura resultando em materiais diferentes por meio de processos de funcionalização dos grupos hidroxila.

A fosforilação e a esterificação estão entre as modificações mais comuns encontradas na literatura. Dentre as duas modificações, a fosforilação das microfibras de celulose é adequada para este trabalho pela facilidade de organização e pela possibilidade de funcionalização dos grupos hidroxilas por grupos fosfatos [35].

A fosforilação das C μ F vai viabilizar a fixação de íons cálcio através de ligações químicas com grupos fosfato, ambos componentes do biovidro 58S. Além disso, juntamente com o fosfato e o cálcio, a sílica é outro componente essencial na construção do *Scaffold* de biovidro 58S. As microfibras de celulose fosforiladas e adicionadas de cálcio são, estrategicamente, utilizadas para adsorver a sílica e, posteriormente, construir o *Template* com composição similar à do biovidro detalhado (seção 1.1) nesta introdução.

1.3. Fixação de íons cálcio e sílica pelas microfibras fosforiladas de celulose

Para obtenção do *Scaffold* de biovidro utilizando C μ F como *Template* é necessário que as C μ F sejam funcionalizadas com grupos fosfatos e, posteriormente, “revestidas” com os demais componentes do biovidro 58S, respeitando a composição deste material. Para tanto, uma funcionalização química da superfície das C μ F com grupos fosfato é o primeiro passo para a construção do *Scaffold* de biovidro. A fosforilação das microfibras possibilita a fixação de íons cálcio através de ligação com o grupo fosfato originando as microfibras fosforiladas e reagidas com cálcio, P- C μ F+Ca²⁺.

Além da incorporação de cálcio e fosfato o biovidro 58S contém sílica e para incorpora-la as microfibras foi usada a estratégia de adsorver sílica produzida por hidrólise de TEOS segundo o Método Stöber.

A sílica foi adsorvida sobre as microfibras pelo ajuste de potencial zeta. Desta forma, uma alternativa interessante para favorecer a interação sílica/P-C μ F+Ca²⁺ é modificar as cargas presentes na dispersão com o surfactante catiônico CTAB (hexadecyltrimethylammoniumbromide) [36,37,38], pois a hidrólise do TEOS em meio básico produz sílica carregada negativamente, uma vez que o pH do meio reacional é próximo de 10 e o ponto isoelétrico da sílica é, aproximadamente, em pH= 2,4 [39].

1.4. Formação dos *templates* de microfibras fosforiladas após fixação de íons cálcio e adsorção de sílica

Dispersões de microfibras de celulose se organizam em estruturas porosas quando submetidas à centrifugação e congelamento controlados seguidos de liofilização.

As microfibras de celulose fosforiladas após a fixação de íons cálcio e adsorção de sílica foram centrifugadas, congeladas verticalmente em Nitrogênio líquido e liofilizadas [40].

A centrifugação controlada da dispersão resulta em uma frente de sedimentação que separa o sistema em uma região de sedimento e uma região

sobrenadante. O sedimento durante o congelamento vertical, utilizando o sistema Dip-coating para controle da velocidade, sofre um processo resultante da nucleação e do crescimento ordenado de cristais de gelo uniformemente distribuídos e interconectados, segregando o material sólido presente. Posteriormente, a liofilização sublima o gelo presente no sistema criando espaços porosos levando à formação do *Template*.

1.5. Calcinação dos *Templates* para obter os *Scaffolds* de biovidro

A calcinação do *Template* permite a consolidação da rede da sílica juntamente com o fosfato e íons cálcio presentes. A calcinação não ocasiona a destruição da estrutura organizada criada previamente pela organização das $P-C\mu F+Ca^{2+}$, a qual foi copiada ao ser recoberta pela sílica [41,42,43,44].

A obtenção de biovidro e não de vitrocerâmicos é um desafio a ser superado neste trabalho. Além desta característica é desejável que, após a calcinação, o *Scaffold* apresente paredes dos poros pouco espessas, garantindo uma elevada área superficial para a lixiviação de íons e demais fatores que estimulem a osteogênese [45,46].

Neste trabalho, os *Scaffolds* de biovidro foram obtidos realizando a calcinação dos *Templates* [47,48]. Os *scaffolds* foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura e apresentaram uma estrutura lamelar com 50 a 100 μm entre elas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Obter *scaffolds* de biovidro 58S a partir da formação de *Templates* formados por microfibras de celulose modificadas com grupos fosfatos após fixação de íons cálcio e adsorção de sílica.

2.1.1. Objetivos Específicos

- Obter microfibras de celulose funcionalizadas com grupos fosfatos;
- Fixar íons cálcio e adsorver sílica sobre as microfibras de celulose pelo ajuste da carga superficial;
- Organizar as microfibras funcionalizadas, após a fixação de íons cálcio e adsorção de sílica em *Templates*;
- Calcinar os *Templates* em temperaturas e tempos de calcinação variados para obter *scaffolds* de biovidro 58S;
- Caracterizar os *scaffolds* de biovidro 58s quanto à composição do biovidro, porosidade e conectividade dos poros.

**CAPÍTULO I: SÍNTESE DAS MICROFIBRAS DE CELULOSE, FOSFORILAÇÃO E
ADIÇÃO DE ÍONS CÁLCIO E SÍLICA PARA CONSTRUÇÃO DOS *TEMPLATES***

3. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS MICROFIBRAS DE CELULOSE FUNCIONALIZADAS COM GRUPOS FOSFATOS E ADIÇÃO DE ÍONS CÁLCIO

3.1. Procedimento experimental para obtenção das microfibras de celulose

A Figura 4 mostra as etapas do processo de preparação das C μ F a partir da hidrólise de papel filtro sem cinzas com ácido fosfórico. Essas etapas serão detalhadas no texto.

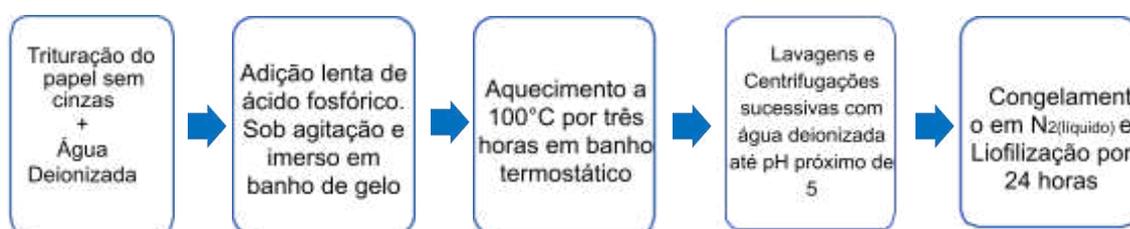


Figura 4: Procedimento para a síntese das microfibras de celulose por hidrólise com ácido fosfórico a partir do papel de filtro sem cinzas.

3.1.1. Materiais

As microfibras de celulose foram extraídas a partir do papel Whatman picado imerso em 100 ml de água deionizada e triturado com auxílio de um mixer doméstico (Oster 450W).

Os reagentes Ácidos fosfóricos 98% P.A foi adquiridos da *Dinâmica*.

3.1.2. Síntese da dispersão de microfibras de celulose (C μ F) por hidrólise com ácido fosfórico a partir de papel de filtro Whatman

A síntese foi realizada modificando-se o procedimento reportado por Espinosa no artigo “Isolation of Thermally Stable Cellulose Nanocrystals by Phosphoric Acid Hydrolysis [49].

2,0 g de papel de filtro Whatman sem cinzas foi reduzido a pequenos pedaços e disperso em 100 mL de água deionizada por 24 horas.

Em seguida foi triturado com o auxílio de Mixer doméstico (Oster 450W) em pequenos pulsos de 2 minutos por um tempo total de 30 minutos. À pasta resultante adicionou-se, lentamente, 278 mL de ácido fosfórico 98% em banho de gelo seguida da hidrólise por 3 horas a 100°C com temperatura controlada com o uso de Banho termostático (Lauda).

A mistura límpida e amarelada resultante da hidrólise foi vertida em água deionizada (2:10 v/v) resultando uma dispersão branca que foi submetida à centrifugação a 3500 rpm por 30 min. O precipitado foi lavado com água destilada por ciclos repetidos de dispersão e centrifugação até que o sobrenadante apresentasse pH em torno de 5.

Após a etapa de lavagem, o precipitado foi tratado com ultrassom de ponteira com 40% de amplitude por 20 min. A pasta foi congelada com nitrogênio líquido, N₂, e liofilizada por 24 horas.

A Figura 5 mostra fotos das dispersões de microfibras em cada etapa da síntese.

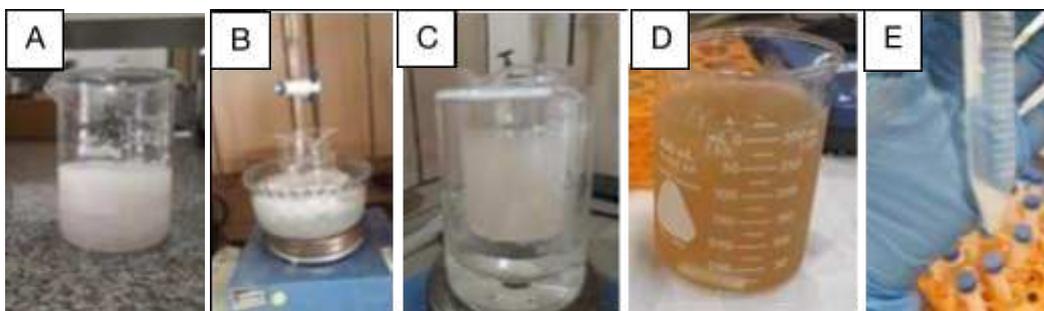


Figura 5: Fotos das etapas da síntese das microfibras. A) Papel whatman com água deionizada após ser triturado com auxílio de um mixer; B) Adição lenta de ácido fosfórico a dispersão de papel imersa em banho de gelo; C) Aquecimento em banho termostato; D) Dispersão após etapa de aquecimento em banho Lauda; E) Microfibras de celulose após lavagens e centrifugações.

Após a síntese das C_μF, os itens abaixo descrevem os procedimentos utilizados para a funcionalização das C_μF com grupos fosfatos, adição de cálcio para determinação de quantitativa de grupos fosfatos e a determinação do potencial zeta em todas as etapas.

3.2. Procedimento experimental para funcionalização das C_μF com grupos fosfatos

O sólido resultante da síntese das microfibras de celulose foi funcionalizado com grupos fosfatos através da reação com ácido metafosfórico. A modificação foi realizada modificando o procedimento descrito na literatura por Mucalo (2019) [50].

A Figura 6 mostra as etapas de fosforilação das C_μF a partir da reação com ácido metafosfórico, dimetilformamida (DMF) e Ureia.

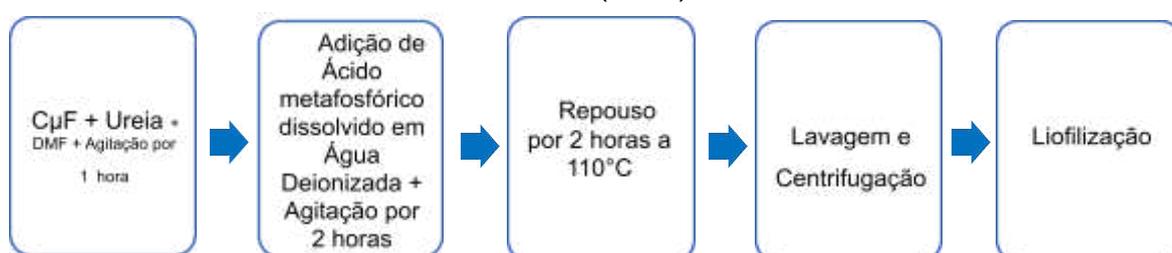


Figura 6: Procedimento para funcionalização das microfibras de celulose com ácido metafosfórico em DMF e ureia.

3.2.1. Materiais

As microfibras de celulose foram funcionalizadas com grupos fosfato em meio de ureia e DMF utilizando ácido metafosfórico.

O N-N Dimetilformamida (DMF) 99,8% P.A. foi adquirido da *Dinâmica*. O Ácido metafosfórico em bastão P.A foi adquirido da *Êxodo Científica*. Chapa de aquecimento *IKA-RH Basic 2*.

3.2.2. Síntese das microfibras de celulose fosforiladas (P-C_μF)

3 g de C_μF liofilizado foram dispersos em água deionizada e adicionados 100 mL de DMF e 40 g de ureia. A dispersão foi mantida sob agitação magnética por 1 hora à temperatura ambiente. Após 1 hora, acrescentou-se 20 g de ácido metafosfórico dissolvido em 100 mL de água deionizada. A dispersão foi mantida sob agitação por 2 horas a temperatura ambiente. Após este período a mistura foi aquecida a 110°C por mais 2 horas com o auxílio de banho termostático e em seguida resfriada rapidamente com o emprego de banho de gelo. Após o término da reação o produto foi lavado em ciclos de centrifugação e redispersão até pH próximo

de 6 e novamente liofilizado.

A Figura 7 mostra, de forma simplificada, a reação de fosforilação das C μ F.

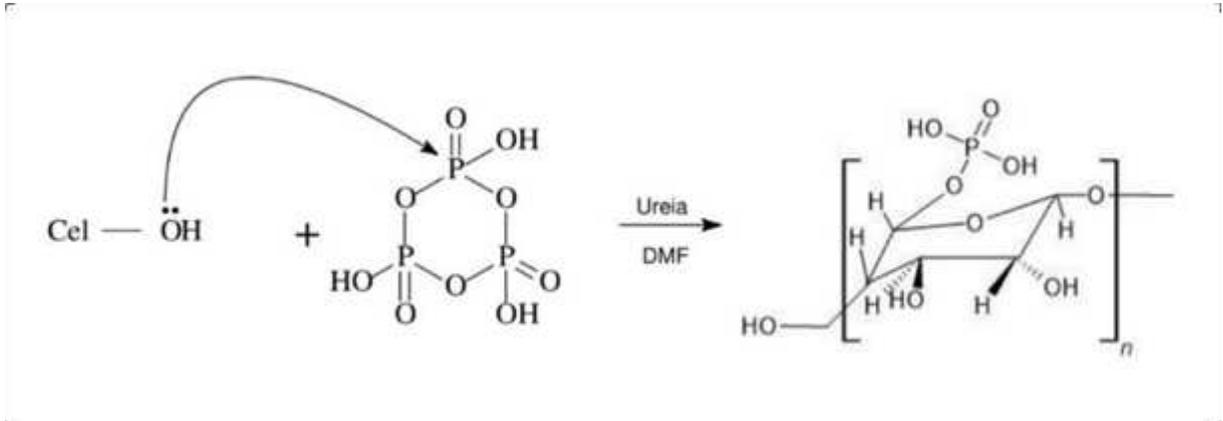


Figura 7: Proposta de reação de modificação de celulose com grupos fosfatos a partir da reação com ácido metafosfórico em DMF e ureia [51].

3.3. Determinação do grau de fosforilação por titulação indireta de complexação com íons cálcio

Para determinar o grau de fosforilação das microfibras de celulose modificadas, P-C μ F, os grupos fosfatos ligados a elas, foram titulados de forma indireta com íons cálcio em pH=10.

Cerca de 0,7 g das P-C μ F, foram dispersas em 100 mL de solução de nitrato de cálcio 0,02 mol.L⁻¹ com o pH da dispersão ajustado em 10 com solução básica de hidróxido de amônia 0,001 mol.L⁻¹ e agitada por 2 horas sob atmosfera inerte.

A dispersão foi centrifugada e 10 mL do sobrenadante titulado com EDTA 0,02 mol.L⁻¹ e negro de eriocromo T. A titulação foi realizada em triplicadas e os volumes de EDTA utilizados na titulação foram usados permitiram quantificar o número de mols de íons cálcio em excesso e, conseqüentemente, os ligados aos grupos fosfatos, possibilitando a determinação da quantidade de grupos fosfatos ligados nas P-C μ F.

Além da titulação indireta com íons cálcio o grau de fosforilação também foi determinado pela análise de TGA. Para realizar a determinação do grau de fosforilação por TGA foi utilizado o precipitado resultante da reação entre as P-C μ F e solução de nitrato de cálcio liofilizado.

3.4. Determinação do grau de fosforilação por análise térmica, TGA

Para realizar a determinação do grau de fosforilação por TGA, P-CuF foram reagidas com solução de íons Ca^{2+} em excesso e em $\text{pH}=10$, calculado a partir do grau de fosforilação determinado por titulação. A dispersão foi centrifugada mantendo o $\text{pH}=10$ e o sólido lavado com tampão NH_3/NH^+ para a retirada do excesso de Ca^{2+} . O Sólido foi liofilizado e utilizado para a realização do TGA em atmosfera oxidante e entre 50 a 1000°C .

3.5. Preparação dos *Templates* pela organização das microfibras

Para a síntese do *Scaffold* de biovidro a partir do *Template* formado pelas microfibras de celulose fosforiladas é necessário que além dos grupos fosfatos e dos íons cálcio ligados a eles, haja a fixação de sílica.

A determinação do grau de fosforilação das microfibras de celulose permitiu quantificar os Ca^{2+} que foram fixados por estes grupos e também calcular a quantidade de sílica para a formação do biovidro 58S (BG58S) seguindo a composição 58% SiO_2 , 33% CaO e 9% P_2O_5 (w/w%).

Após a determinação do grau de fosforilação nos itens 3.3 e 3.4 foi realizado a adição de íons cálcio com solução de nitrato de cálcio $0,02 \text{ mol. L}^{-1}$ em quantidade necessária, previamente calculadas, obtendo as $\text{P-CuF}+\text{Ca}^{2+}$. Essa etapa foi realizada em $\text{pH}=10$ e em ambiente inerte com uso de gás nitrogênio (N_2) para evitar a formação de carbonato de cálcio a partir do CO_2 presente na atmosfera.

A estratégia utilizada para adsorver sílica sobre as microfibras de celulose fosforiladas e adicionadas de íons cálcios, $\text{P-CuF}+\text{Ca}^{2+}$ foi à modificação da carga superficial das microfibras de celulose.

A Figura 8 mostra as etapas do processo para adicionar sílica as $\text{P-CuF}+\text{Ca}^{2+}$, componente para construção dos *Templates* através da modificação da carga superficial das microfibras de celulose. Essas etapas serão detalhadas nos itens abaixo.



Figura 8: Processo para síntese de sílica as P-C μ F+Ca $^{2+}$ dispersas em CTAB 0,015 mol.L $^{-1}$.

3.5.1. Materiais

Os reagentes TEOS, CTAB e etanol 98% foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

O hidróxido de amônio (NH $_4$ OH) foi adquirido da Synth.

3.5.2. Determinação do Potencial zeta das microfibras de celulose

O potencial zeta das nanopartículas de Sílica de Stöber em pH=10 é negativo (Ponto isoelétrico da sílica é 2,4). Para a adsorção da sílica foi necessário ajustar o potencial zeta das P-C μ F+Ca $^{2+}$ para valores positivos e por esse motivo foi escolhido um surfactante catiônico CTAB. O experimental descrito a seguir mostra como este objetivo foi alcançado.

A modificação da carga superficial das microfibras de celulose pelo surfactante CTAB foi analisada pelo potencial zeta utilizando o equipamento Malvern, modelo ZetasizerNano Zs-Zen3600, laser de 633 nm, ângulo de medida 173 e temperatura de 25 °C.

O potencial zeta das dispersões de: C μ F, P-C μ F e P-C μ F+Ca $^{2+}$ foram determinadas em água deionizada e o potencial zeta da dispersão de P- C μ F+Ca $^{2+}$ em solução de CTAB 0,015 mol.L $^{-1}$.

3.5.3. Preparação das Dispersões de Microfibras fosforiladas contendo cálcio e sílica

Após a determinar o grau de fosforilação das microfibras de celulose modificadas, P-C μ F, os experimentos seguiram levando em consideração as quantidades de grupos fosfato quantificados.

Cerca de 1,42 g das P-C μ F liofilizadas, foram dispersas em 20 mL de água deionizada e 20 mL de solução de nitrato de cálcio 0,02 mol.L⁻¹ com o pH da dispersão ajustado em 10 com solução básica de hidróxido de amônia 0,001 mol.L⁻¹ e agitada por 120 min sob atmosfera inerte.

As P-C μ F+Ca²⁺ foram centrifugada e dispersas em solução de CTAB 0,015 mol.L⁻¹ e o sistema permaneceu sob agitação magnética por 10 minutos para homogeneização completa.

Em seguida foram adicionados 20 mL de água deionizada, 80 mL de etanol 98%, 10 ml de solução etílica 4,2% (v/v) e TEOS em quantidade suficiente para formação da sílica. A dispersão permaneceu sob agitação magnética, a temperatura ambiente, por 20h para a hidrólise completa do TEOS e formação da sílica.

A Figura 9 mostra imagens da dispersão após adição de todos os reagentes e após o processo de hidrólise de 20 horas.

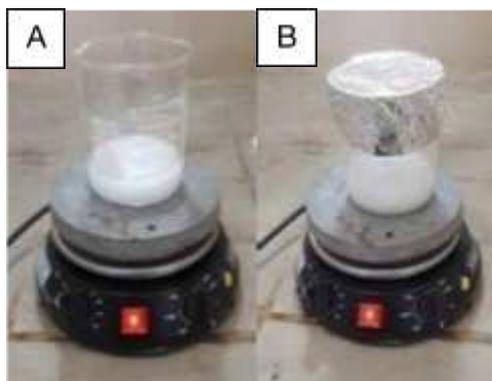


Figura 9: Imagens durante o processo de reação de hidrólise da sílica com o uso de TEOS. A) Início da hidrólise; B) Hidrólise após 20h.

3.6. Preparação dos *Templates* por congelamento e liofilização das dispersões preparadas no item 3.5.3

O etanol presente no meio reacional foi removido, após o término da reação, por lavagens sucessivas com solução tampão de amônio, pH=10, até a remoção do etanol. A centrifugação controlada foi realizada em 15 min a 2000 rpm.

O estudo sobre o tempo de centrifugação foi realizado em trabalho anterior do Grupo de Pesquisa utilizando a Centrífuga Analítica Lumisizer.

A remoção do etanol é essencial para que a dispersão possa ser

congelada e mantenha a estabilidade para ser liofilizada após o procedimento.

Para o procedimento de congelamento das amostras após centrifugação controlada, para organização do *Template*, foi feito o congelamento vertical lento.

Neste processo o precipitado resultante da centrifugação foi inserido em uma seringa de 10 mL e mergulhado verticalmente em N₂ líquido com a utilização de um sistema *Dip-coating* com velocidade controlada de 0,55 cm.min⁻¹.

Após o término do congelamento, a ponta da seringa foi cortada, usando um estilete, permitindo a extrusão do material congelado com o auxílio do êmbolo presente no encaixe da seringa. A Figura 10 mostra a seringa contendo a dispersão 'presa' ao sistema *Dip-coating*.



Figura 10: Sistema Dip Coating utilizado para o congelamento lento através do controle de velocidade em cm.min⁻¹.

4. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

4.1. Determinação da distribuição de tamanho das CuF por espalhamento de luz estático usando Mastersize 2000

Para as medidas da distribuição do tamanho de partículas, as amostras foram dispersas na unidade Hidro do MasterSize 2000 com água deionizada usada como dispersante. As microfibras CuF foram previamente dispersas em água deionizada usando banho de ultrassom até obter um material sem aglomerados visíveis. Os resultados foram obtidos através do software do equipamento.

4.2. Determinação de cristalinidade das C_μF e *Template* por difração de raio-X

As análises foram feitas utilizando um difratômetro da marca Shimadzu, modelo XRD7000. Os difratogramas foram obtidos em um intervalo de 2θ de 5° a 50° com uma velocidade de 2° min^{-1} , utilizando alvo de Cu ($1,54 \text{ \AA } K\alpha$), voltagem de 30 kV e corrente de 10 mA.

Aproximadamente 100 mg das amostras de C_μF foram prensadas em um suporte de vidro com 3 cm de diâmetro e 1 mm de profundidade.

4.3. Ressonância magnética nuclear (NMR) de ³¹P das C_μF e P-C_μF

As análises de MAS-NMR ³¹P foram feitas com as mostras de C_μF e P-C_μF no equipamento *Bruker 400 MHz MAS 4 BL CP BB* em rotor de zircônia com 4 mm de diâmetro, rotação máxima de 15 kHz, 128 varreduras a temperatura de 22 °C. Para recuperação dos dados foi utilizado o software TopSpin.

4.4. Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das C_μF e P-C_μF

As amostras foram analisadas por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) em um espectrofotômetro Agilent Technologies Cary 630 (Agilent) equipado com uma unidade de Transmitância. Os espectros foram obtidos na faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

As amostras foram preparadas na forma de pastilhas a 1% em KBr. O KBr utilizado para a análise de transmitância foi seco na Mufla *EDG 3P-S* durante 3 horas a 300°C.

4.5. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) das C_μF, P-C_μF e *Template*

As análises por Microscopia Eletrônica de Varredura foram realizadas de duas maneiras: as C_μF foram dispersas em água deionizada, depositadas sobre lâmina de mica que estava fixada no “Stubs” e foram secas à temperatura ambiente

em um Dessecador com vácuo.

- As microfibras de celulose foram dispersas em banho de ultrassom com água deionizada 1:100 (v/v) e 5 µL da dispersão foram depositadas sobre a lâmina de mica que estava fixada no “Stubs” e foram secas à temperatura ambiente em um Dessecador com vácuo. Por fim, metalizadas pela deposição de Carbono
- As amostras de CµF, P-CµF e *Template* liofilizadas foram montadas sobre “Stubs” metálicos com fitas de carbono e/ou cola de carbono e metalizadas.

Foram obtidas micrografias de todas as amostras no equipamento *Quanta FEG 250* a uma tensão de aceleração de 2, 5 e 10 kV.

4.6. Determinação do grau de fosforilação por titulação indireta das amostras de P-CµF com solução de Ca^{2+}

Para determinar o grau de fosforilação das microfibras de celulose funcionalizadas, P-CµF, os grupos fosfatos ligados a elas foram titulados de forma indireta com solução de íons cálcio em pH=10. A reação com íons Ca^{2+} não só permite determinar o grau de fosforilação, mas também, mostra que estes íons que são um dos constituintes do biovidro 58S irão ser fixados no *Template* formado pelas microfibras.

Cerca de 0,7 g das P-CµF, foram dispersas em 100 mL de solução de nitrato de cálcio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$. O pH da dispersão foi ajustado em 10 com solução básica de hidróxido de amônia $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$ e agitada por 2 horas sob atmosfera inerte. A dispersão foi centrifugada e 10 mL do sobrenadante titulado com EDTA $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ e negro de eriocromo T. A titulação foi realizada em triplicadas e os volumes de EDTA utilizados na titulação foram usados permitiram quantificar o número de mols de íons cálcio em excesso e, conseqüentemente, os ligados aos grupos fosfatos, possibilitando a determinação da quantidade de grupos fosfatos ligados nas P-CµF.

4.7. Determinação do grau de fosforilação por TGA das P- $\text{CuF}+\text{Ca}^{2+}$

As amostras de P- CuF foram suspensas em solução básica $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$ de hidróxido de amônio até $\text{pH}=10$ e 100 mL de solução de nitrato de cálcio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$. A dispersão foi mantida sob agitação em atmosfera inerte por 2 horas.

Para titulação, a dispersão foi centrifugada e 10 mL do sobrenadante adicionado de solução tampão $\text{pH}=10$ e titulado com EDTA $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ e indicador negro de eriocromo T.

4.8. Determinação dos potenciais zeta das dispersões de: CuF , P- CuF , P- $\text{CuF}+\text{Ca}^{2+}$ e P- $\text{CuF}+\text{Ca}^{2+}$

Para as determinações dos potenciais zeta as amostras foram dispersas a 1% em água deionizada e as amostras de P- $\text{CuF}+\text{Ca}^{2+}+\text{CTAB}$ foram analisadas em solução de CTAB $0,015 \text{ mol.L}^{-1}$. As medidas foram realizadas com o auxílio da cubeta *disposable folded capillary cells* (Malvern), a temperatura ambiente.

O potencial zeta (ζ) foi determinado usando o equipamento *ZetasizerNano Zs- Zen3600* (Malvern). Os resultados foram obtidos através do software do equipamento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Obtenção e caracterização das CuF por distribuição de tamanhos por espalhamento de luz estático, ressonância magnética nuclear e microscopia eletrônica de varredura

Apesar da expectativa de modificação das microfibras com grupos fosfatos pela hidrólise do papel Whatman com ácido fosfórico ela não ocorreu [49,50].

Para confirmar as microfibras foram caracterizadas por Ressonância Magnética Nuclear de ^{31}P . O espectro de RMN ^{31}P mostrado na Figura 11 confirma que a fosforilação não ocorreu apesar das referências indicarem a possibilidade de reação, para outras condições de reação e materiais celulósicos diferentes, principalmente CNC [49,50].

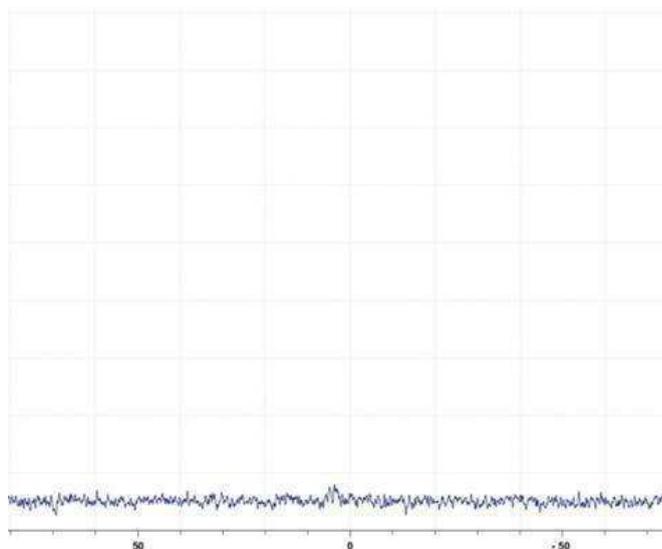


Figura 11: Espectro RMN para ^{31}P da microfibras de celulose liofilizada e antes da funcionalização.

A caracterização das microfibras de celulose obtidas pela hidrólise do papel de filtro Whatman com ácido fosfórico, como descrito no item 3.1, resultou em uma dispersão turva que apresentou decantação lenta. Essa turbidez e decantação lenta indicam possíveis formações de aglomerados das partículas.

A distribuição de tamanho das microfibras de celulose foi determinada por Espalhamento de luz Estático usando o Malvern 2000 e o resultado é mostrado na Figura 12.

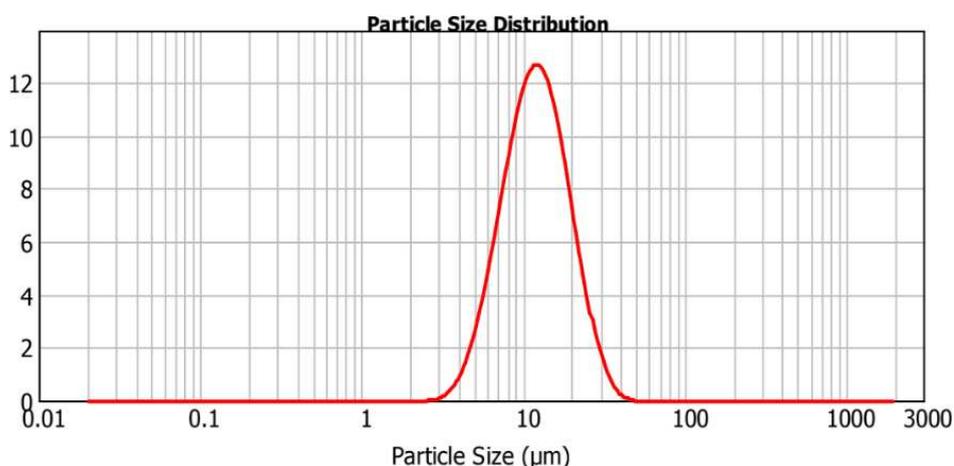


Figura 12: Distribuição de tamanho para a dispersão das microfibras de celulose, C_μF, obtidas pela hidrólise do papel Whatman com ácido fosfórico 85%.

A Figura 12 ilustra a distribuição de tamanho das microfibras, que se concentram em torno de 12 μm , com possíveis aglomerados que variam de tamanho

entre 3 a 40 μm .

Além da distribuição de tamanho, as microfibras também foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) para observar a homogeneidade da distribuição de tamanho em comparação com os dados analisados na Figura 12.

A Figura 13 mostra a micrografia da dispersão de microfibras dispersas em uma lâmina de mica e preparada conforme descrito no item 5.5. A micrografia mostrada na Figura 13 indica que as C μ F possuem um comprimento aproximado de 2 μm [8].

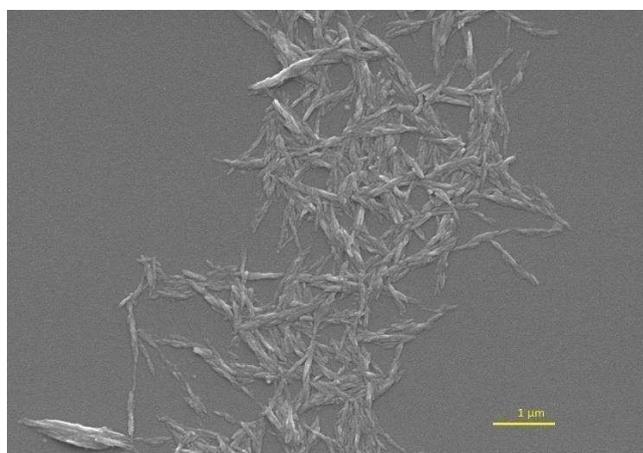


Figura 13: Micrografia das microfibras de celulose (C μ F) após liofilização e dispersas em água deionizada.

Esse resultado diverge da análise de distribuição de tamanho exibida na Figura 12, possivelmente na dispersão, analisadas pelo espalhamento existem aglomerados de C μ F que não estão presentes na Figura 13. Na preparação para as micrografias, as microfibras foram melhor espalhadas ao depositar uma quantidade muito pequena de dispersão sobre a mica.

5.1.1. Determinação da cristalinidade das C μ F

A cristalinidade das C μ F foi analisada por Difração de Raios- X (DRX). O difratograma obtido, mostrado na **Figura 14**, é semelhante aos difratogramas de nanocristais e microfibras de celulose citados na literatura [52].

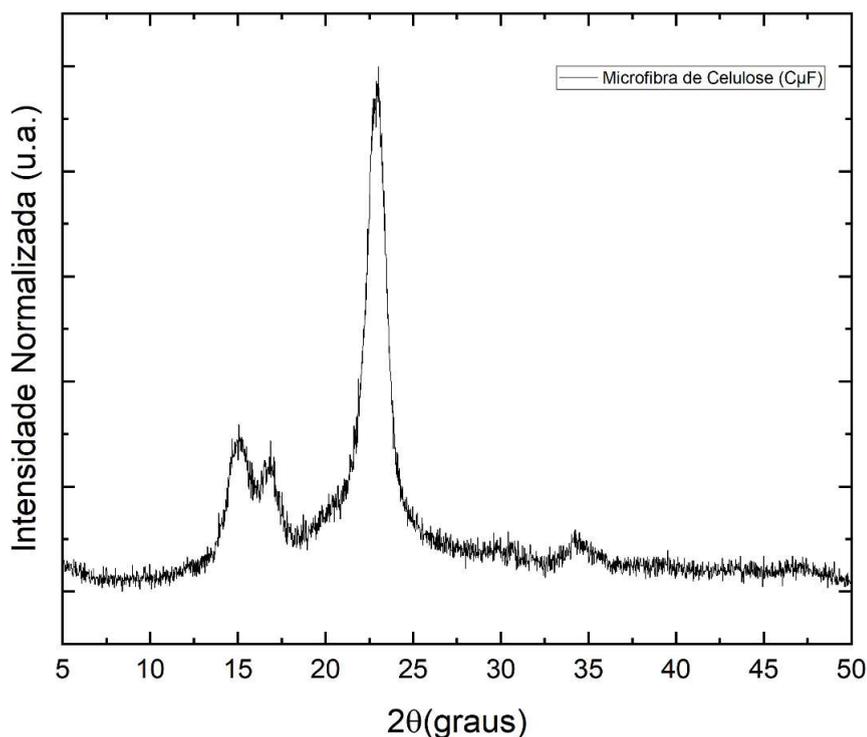


Figura 14: Difratograma das microfibras de celulose obtidas por hidrólise ácida com ácido fosfórico 98% PA.

Segundo Granja e Chen Yang [53,54], os picos cristalinos em 2θ em torno de $14,5^\circ$, $16,5^\circ$, $22,5^\circ$ e $34,8^\circ$, como os observados na Figura 14, são característicos de materiais cristalinos derivados da celulose.

5.2. Obtenção e caracterização das P-C μ F por MAS-NMR ^{31}P e FTIR

Para obtenção do *Scaffold* de biovidro utilizando as C μ F como *Template* é necessário que as C μ F sejam funcionalizadas com grupos fosfatos e, posteriormente, “revestidas” com os demais componentes do biovidro. Para tanto, uma funcionalização química da superfície das C μ F com grupos fosfato é o primeiro passo para a construção do *Scaffold* de biovidro.

Atualmente, o método mais eficiente para obtenção de microfibras de celulose fosforiladas (P-C μ F) é a esterificação, que modifica quimicamente a estrutura da celulose através da introdução de grupos aniônicos. O grupo aniônico desejado neste trabalho é o fosfato, ou seja, a fosforilação dos grupos hidroxila das microfibras de celulose [35,55].

A reação química de fósforo combinado com ureia, Figura 7, é bastante adequada nesse trabalho por permite um melhor controle da fosforilação oxidativa,

uma menor solubilização do derivado de celulose, evitar a degradação da celulose, e promover o inchaço da celulose para facilitar a penetração do agente de fosforilação [56].

Para verificar a efetividade da funcionalização, as microfibras de celulose foram analisadas usando as técnicas de MAS-RMN ^{31}P e FTIR.

No espectro de RMN ^{31}P mostrado na figura 15, pode-se observar sinais intensos em 3,7835; 2,9955 e -3,8285 ppm. Na literatura é indicado que os picos observados na faixa de deslocamento químico de -10 a 10 ppm estão relacionados a diferentes tipos de ésteres de fosfato. Os picos nessa região estão associados à monoésteres de fosfatos – $\text{H}_2\text{PO}_4\text{R}'$ (0 a 10 ppm), ortofosfato – PO_4^{3-} (0 a 5 ppm) e diésteres de fosfato – $\text{HPO}_4\text{R}'\text{R}''$ (-5 a 0 ppm) [57,58].

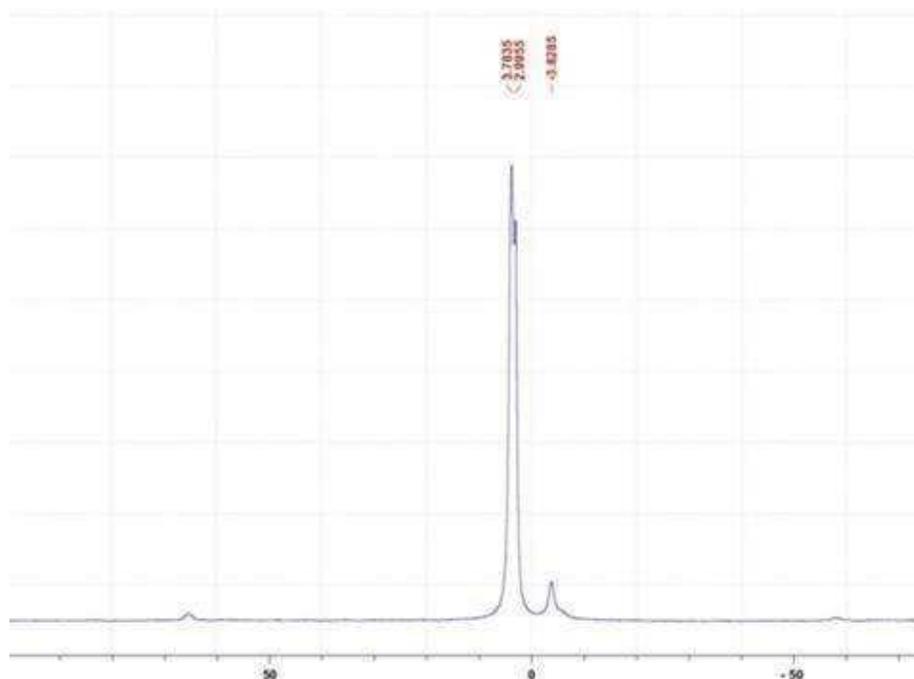


Figura 15: Espectro RMN para ^{31}P do material funcionalizado com grupos fosfato.

A literatura indica que os sinais com pico mais largo em 3,7835 e 2,9955 ppm podem ser atribuídos a sobreposições múltiplas do mesmo sinal de fosfato [57,58,59]. Para corroborar os resultados obtidos por Ressonância Magnética Nuclear foi realizada análise de Espectroscópica de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para as $\text{C}\mu\text{F}$ e $\text{P}-\text{C}\mu\text{F}$, mostrados na Figura 16.

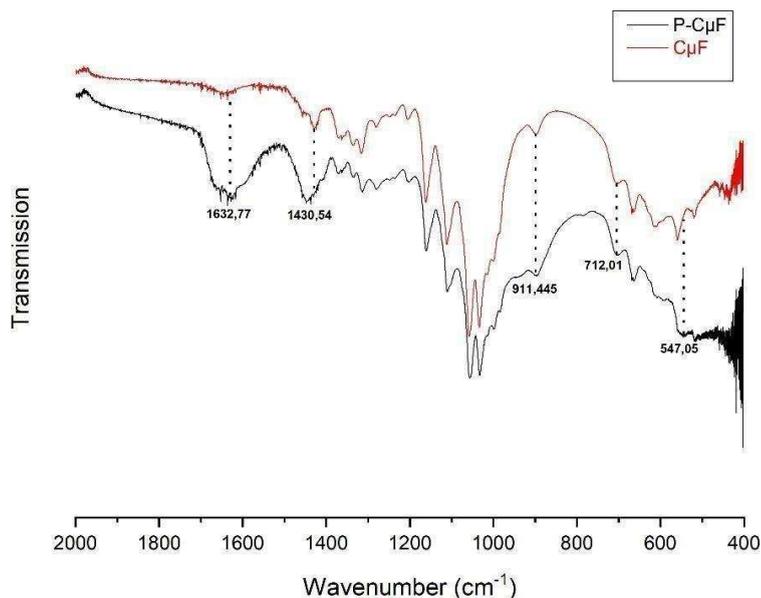


Figura 16: Espectro no Infravermelho da CuF em vermelho e da P-CuF em preto.

Os espectros mostram os picos de absorbância para a estrutura da microfibrila de celulose após reação de hidrólise com ácido fosfórico, CuF, em vermelho e em preto para as microfibrilas de celulose fosforiladas, P-CuF.

Os picos na região de 1634–900 cm^{-1} são atribuídos à vibração das moléculas de água absorvidas pela celulose.

Os picos observados na faixa de 1420–1430 cm^{-1} são atribuídos às vibrações de flexão dos grupos C-H. Confirmando que a estrutura da celulose permanece após a reação de fosforilação [60].

O conjunto de bandas em 1200 - 1000 é atribuída a vibrações de alongamento e flexão de ligações OH presente.

As bandas de absorção em 911 cm^{-1} está presente em ambos espectros, pois é atribuída a ligações β -glicosídicas, região amorfa da celulose que foi, apenas, parcialmente dissolvida. Nessa mesma região, 540 – 910 cm^{-1} , a intensidade dos picos que podem indicar a presença do grupo P–OH é muito pequena [61,62].

Portanto, o FTIR é pouco conclusivo para indicar a fosforilação, a qual é claramente mostrada no resultado de MAS- NMR ^{31}P a efetividade da funcionalização com grupos fosfato.

5.3. Determinação do grau de fosforilação das P-C μ F por titulação indireta com íons cálcio (Ca²⁺) e análise termogravimétrica, TGA

Para determinação do grau de fosforilação os grupos fosfatos foram reagidos com íons cálcio em excesso, como descrito no item 3.3. Após a reação das P-C μ F com a solução de cálcio, o sobrenadante é titulado e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 1.

A incorporação de íons cálcio para determinação dos grupos fosfatos presente no material pode ser obtida através da adição de solução de nitrato de cálcio, Ca(NO₃)₂, em meio básico com pH=10, dispersão. A reação sugerida para a reação entre o fosfato e o cálcio está ilustrada na Figura 17.

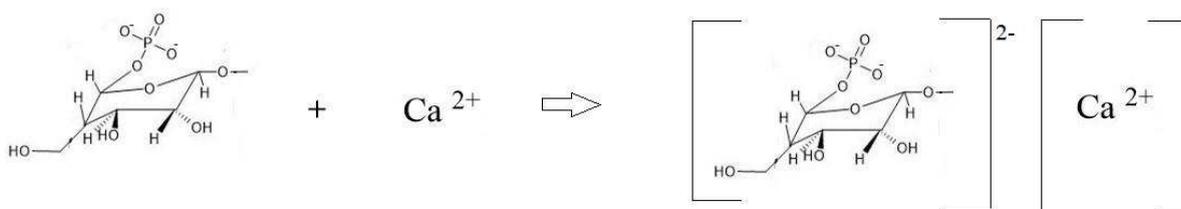


Figura 17: Reação dos grupos fosfatos com íons cálcio

Para determinação do grau de fosforilação os grupos fosfatos foram reagidos com íons cálcio em excesso, como descrito no item 3.3. Após a reação das P-C μ F com a solução de cálcio, o sobrenadante é titulado e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados da Titulação Indireta de Complexação com EDTA $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ obtidos após a reação das P- C μ F com solução de $\text{Ca}^{2+} 0,02 \text{ mol.L}^{-1}$.

	Resultados Experimentais
$m_{\text{P-C}\mu\text{F}}$ (utilizada)	0,6139 g
$V_{\text{Ca}^{2+}}$ (Branco)	10 mL
V_{EDTA} (Branco)	16,4 mL
$n_{\text{Ca}^{2+}}$ (Total)	$3,28 \times 10^{-3}$
V_{EDTA} (Excesso)	13,3 mL
$n_{\text{Ca}^{2+}}$ (Excesso)	$2,66 \times 10^{-3}$ mols
$n_{\text{Ca}^{2+}}$ (Fixados pelos grupos fosfato)	$6,2 \times 10^{-4}$ mols
n_{fosfato} /g de P-C μ F	$1,03 \times 10^{-3}$

Pelo resultado obtido na titulação indireta de complexação com íons cálcio, a quantidade de grupos fosfato, em número de mols, por grama de microfibras de celulose funcionalizadas com grupos fosfatos e liofilizadas é da ordem de $1,03 \times 10^{-3}$.

Para confirmar o resultado obtido na titulação de complexação o precipitado obtido na titulação, P-C μ F+ Ca^{2+} , foi liofilizado e utilizado para análise termogravimétrica, TGA.

A análise foi realizada conforme descrito no item 4.7 e a Figura 18 mostra o resultado da análise de termogravimétrica através do gráfico de Temperatura x massa perdida.

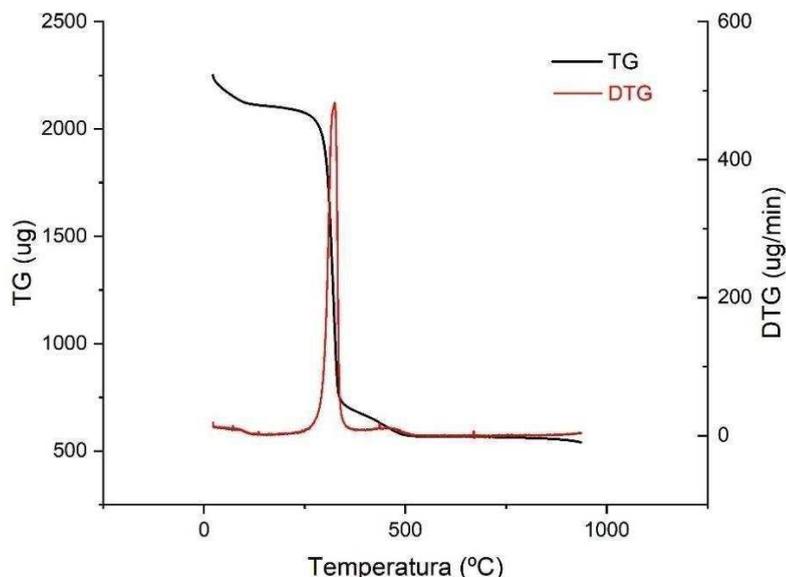


Figura 18: TG e DTG das microfibras de celulose fosforiladas, adicionadas íons Ca^{2+} e liofilizadas.

Para realizar os cálculos de acordo com o resultado do TGA a massa do resíduo obtida no final da análise foi considerada como sendo de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, julgando a estabilidade deste composta a 1000°C . O resultado obtido na análise de TGA para o material P- $\text{CuF} + \text{Ca}^{2+}$ liofilizado é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados da Análise de TGA para P- $\text{CuF} + \text{Ca}^{2+}$.

	Resultados Experimentais
m_i (amostra)	$2,25 \times 10^{-3} \text{ g}$
m_f (Resíduo)	$5,4 \times 10^{-4} \text{ g}$
$n_{\text{Ca}_2+3(\text{PO}_4)_2}$	$1,74 \times 10^{-6} \text{ mols}$
$n_{\text{Ca}^{2+}}$	$5,22 \times 10^{-6} \text{ mols}$
$m_{\text{Ca}^{2+}}$	$2,08 \times 10^{-4} \text{ g}$
$m_{\text{P-CuF}}$	m_i (amostra) - $m_{\text{Ca}^{2+}}$ - $2,04 \times 10^{-3} \text{ g}$
$n_{\text{PO}_4^{-3}}$	$3,54 \times 10^{-6} \text{ mols}$
$N_{\text{PO}_4^{-3}} / \text{g de P-CuF}$	$1,73 \times 10^{-3} \text{ mols de PO}_4^{-3} / \text{g de P-CuF}$

Comparando os resultados da titulação indireta com íons cálcio, Tabela 1,

com os resultados obtidos pela análise de TGA, Tabela 2, pode-se afirmar que número de mols de fosfatos por grama de P-C μ F fixados pelas microfibras é da ordem de 10^{-3} mols de fosfato/g de P-CuF.

A determinação do grau de fosforilação das microfibras de celulose permitiu calcular a quantidade de íons cálcio e sílica necessária para a formação do *Template* para a formação do biovidro 58S (BG58S) considerando a sua composição 58% SiO₂, 33% CaO e 9%P₂O₅ (w/w%) [62,63].

5.4. Preparação da dispersão P-C μ F+Ca²⁺/sílica com uso de CTAB para preparação dos *Templates*

Para preparar os *Templates* que darão origem aos *Scaffolds* de biovidro foi necessário primeiro prepara uma dispersão contendo as microfibras fosforiladas reagidas com cálcio, P-C μ F+Ca²⁺, e sílica gerada pela hidrólise de Tetraetilortosilicato (TEOS).

Como descrito no experimental item 3.5.2, para a adsorção de sílica pelas P- C μ F+Ca²⁺ cálcio foi necessário o ajuste do potencial zeta com o uso de um surfactante catiônico, CTAB.

A concentração de CTAB necessário para adsorção efetiva de sílica foi determinada após um estudo com várias concentrações do surfactante adicionados à dispersão das P-C μ F+Ca²⁺. Este estudo mostrou que que a melhor concentração de CTAB para ser usada na dispersão foi 0,015 mol.L⁻¹.

As análises de potencial zeta foram realizadas em todas as etapas de preparação da dispersão: C μ F, P-C μ F, P-C μ F+Ca²⁺ e P- C μ F+Ca²⁺+CTAB. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para o potencial zeta das microfibras nas diversas etapas da preparação das dispersões que darão origem ao *Template*, conforme detalhado no item 3.5.2.

Tabela 3: Potencial zeta das dispersões de C μ F, P- C μ F, P-C μ F+Ca²⁺ em água e da dispersão de P-C μ F+Ca²⁺+CTAB em solução de CTAB 0,015 mol.L⁻¹.

Dispersões utilizadas para medir o Potencial Zeta	Potencial Zeta (mV)
C μ F	-25,5
P-C μ F	-19,8
P-C μ F + Ca ²⁺	-3,45
P-C μ F + Ca ²⁺ + CTAB	27,9

Segundo os resultados para análise de Potencial Zeta:

- Os valores de potencial zeta negativos, -25,5 mV, que as dispersões das C μ F apresentam ocorre, possivelmente, deve-se à presença de grupos hidroxilas que estão desprotonados em pH entre 5 e 6.
- Após a reação de fosforilação, as P-C μ F apresentam potencial zeta ainda negativos devido a modificação com grupos fosfatos. Provavelmente pela troca de hidroxilas desprotonadas por grupo fosfatos parcialmente ionizados em pH entre 5 e 6.
- A adição de íons Ca²⁺ a dispersão das P-C μ F em pH=10 resulta na reação entre os íons cálcio e os grupos fosfatos formando P-C μ F + Ca²⁺ antes da dispersão em água para a medida de potencial zeta. Causando a maior variação do potencial zeta, como esperado. Pois em pH 10 os grupos fosfatos ligados à cadeia das microfibras estão completamente ionizados e a fixação dos íons Ca²⁺ neutraliza parte das cargas negativas resultando no valor de -3,5 mV.
- Conforme descrito no item 3.5, a adsorção de CTAB pelas microfibras de celulose foi a estratégia utilizada para tornar o potencial zeta positivo, possibilitando a adsorção de sílica preparada pela hidrólise de TEOS em meio básico.

Conforme mostrado na Tabela 3, os resultados para o potencial zeta das P- C μ F+Ca²⁺ em solução de CTAB 0,015 mol.L⁻¹ é igual a 27,9 mV, adequado à adsorção de sílica que apresenta ponto isoelétrico igual a pH 2,4.

5.5. Adsorção de sílica com uso de CTAB

A sílica, um dos componentes do biovidro 58S, foi obtida neste trabalho através da hidrólise do alcóxido tetraetilortosilicato (TEOS). A reação de hidrólise básica para obtenção de sílica que resulta em uma dispersão de partículas e formação de "sóis" proposta por V. Stöber em 1968 [5,50,64].

A hidrólise da sílica em meio básico ocorre segundo a reação apresentada na Figura 19.

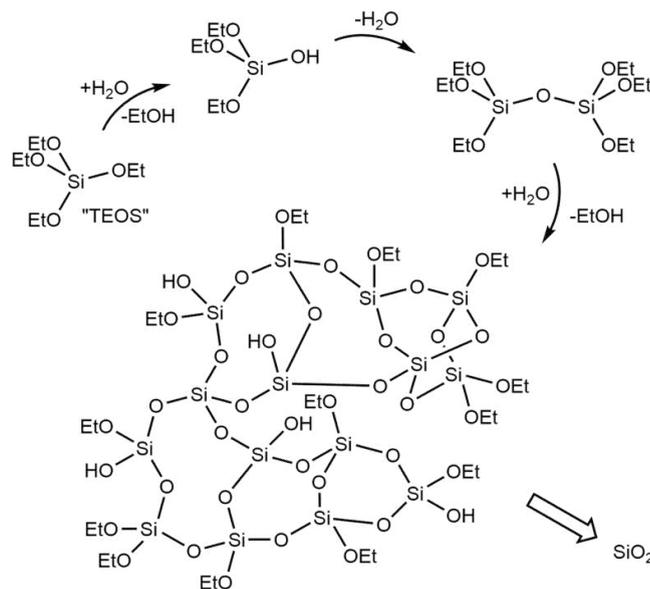
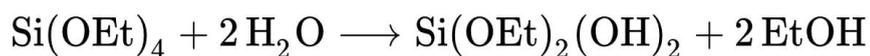
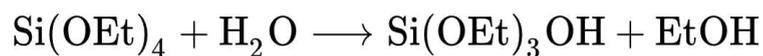
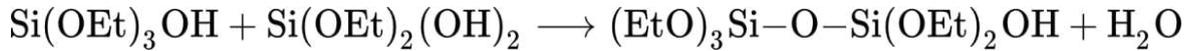
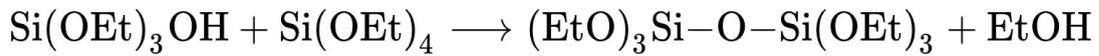
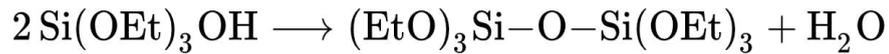


Figura 19: Reação esquemática para obtenção de sílica catalisada por base. Todas as etapas ocorrem simultaneamente.

A adsorção de sílica para construção do *Template* ocorreu de acordo com a hidrólise básica representada na Figura 19 em que as etapas ocorrem simultaneamente. O ortosilicato de tetaetila, precursor da sílica ($\text{Si}(\text{OEt})_4$, TEOS), é hidrolisado em álcool na presença de amônia como catalisador [65,66].



A reação produz etanol e uma mistura de etóxi silanóis, $\text{Si}(\text{OEt})_3\text{OH}$, $\text{Si}(\text{OEt})_2(\text{OH})_2$, e até mesmo $\text{Si}(\text{OH})_4$.



Geralmente, essa reação é utilizada para sintetizar sílica coloidal com tamanhos determinados e controlados, dependendo da concentração de reagentes, temperatura e catalisador.

Com a dispersão P-CuF+Ca²⁺/Sílica a distribuição de tamanho das P-CuF+Ca²⁺/Sílica foi determinada por Espalhamento de luz Estático usando o Malvern 2000 e o resultado é mostrado na Figura 20.

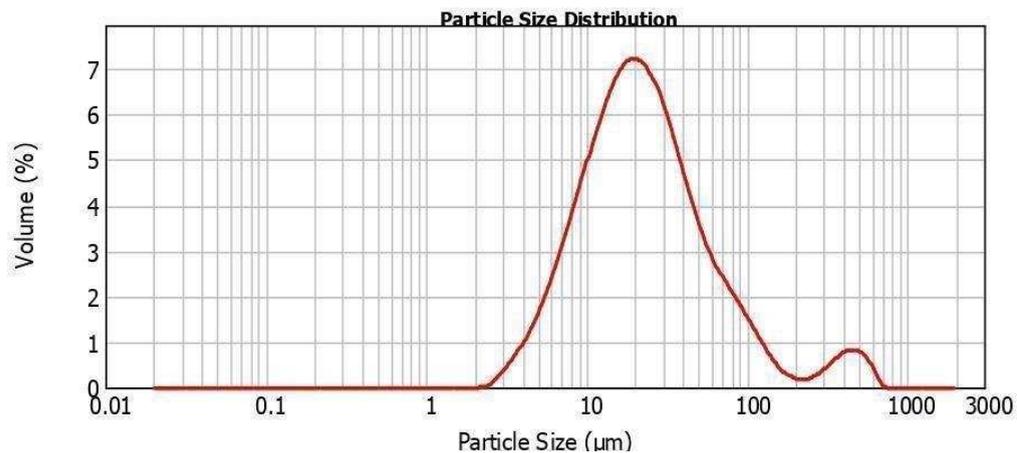


Figura 20: Distribuição de tamanho para a dispersão das P-CuF+Ca²⁺/Sílica obtidas após reação de hidrólise do TEOS em pH 10.

A Figura 20 ilustra a distribuição de tamanho das microfibras, que se concentram em torno de duas populações. Possivelmente, a menor população em torno de 35 µm, com possíveis aglomerados que variam o tamanho de 5 a 110 µm é referente às P-CuF+Ca²⁺/Sílica e a maior população, se aproximando de 1000 µm, pode ser referente aos resíduos de sílica presentes na dispersão.

Neste momento, além de ter sido inserido outros componentes às microfibras que foram analisadas na Figura 20 também ocorre o recobrimento com sílica que contribuiu para o aumento da distribuição de tamanho da dispersão P-CuF+Ca²⁺/Sílica em comparação com a distribuição de tamanho da microfibra pura obtida na Figura 12.

5.6. Formação e caracterização do *Template*

A partir da dispersão em CTAB das P-CuF+Ca²⁺/sílica, o *Template* foi preparado através da centrifugação controlada, congelamento seguido da liofilização, conforme descrito no item 3.6. Este procedimento resulta em um *Template* que possui uma certa resistência mecânica que pode ser manuseado, com cuidado, sem que haja o colapso da estrutura.

A Figura 21 mostra uma foto com o resultado do *Template* obtido após o procedimento detalhado no item 3.6.

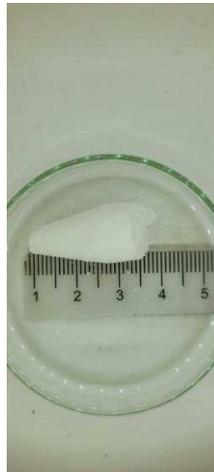


Figura 21: *Template* obtido a partir da dispersão em de P-CuF+Ca²⁺/sílica com CTAB usando como estratégia, centrifugação e congelamento lento, usando o sistema Dip Coating, seguido de liofilização.

O *Template* foi caracterizado por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM). As micrografias são mostradas na Figura 22.

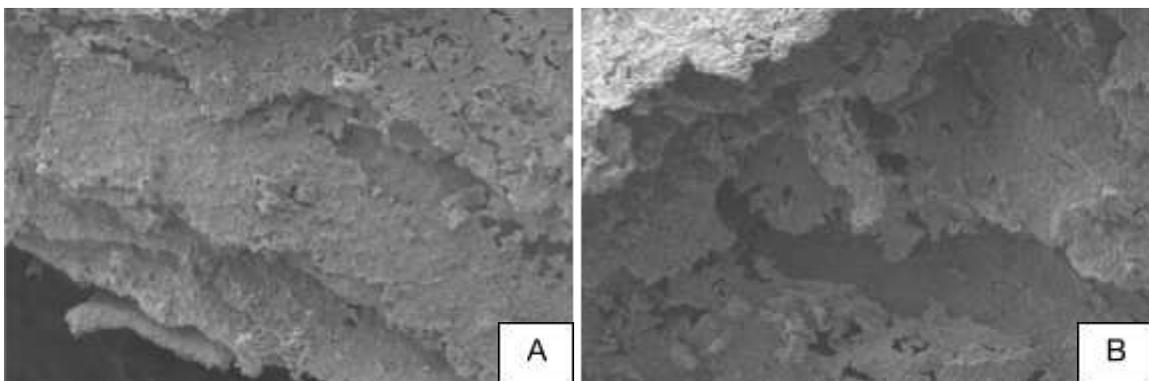


Figura 22: Micrografias do *Template* após o processo de organização através da centrifugação controlada e congelamento seguido de liofilização. A) e B) Correspondem as micrografias do *Template* com aumento de 500 e 100 μm , respectivamente.

Na micrografia observa-se que o *Template* possui uma organização lamelar comprovando que após a liofilização. A organização que foi originada do congelamento vertical lento foi mantida.

Como parte da estratégia para formar o *Template* envolvia a reação dos grupos fosfatos com íons Ca^{2+} , seria esperado que esta reação formasse fosfato de cálcio.

Para investigar a formação de fosfato de cálcio, o *Template* foi analisado por Difração de raios-x. A Figura 23 mostra o difratograma de raios-X para o *Template*.

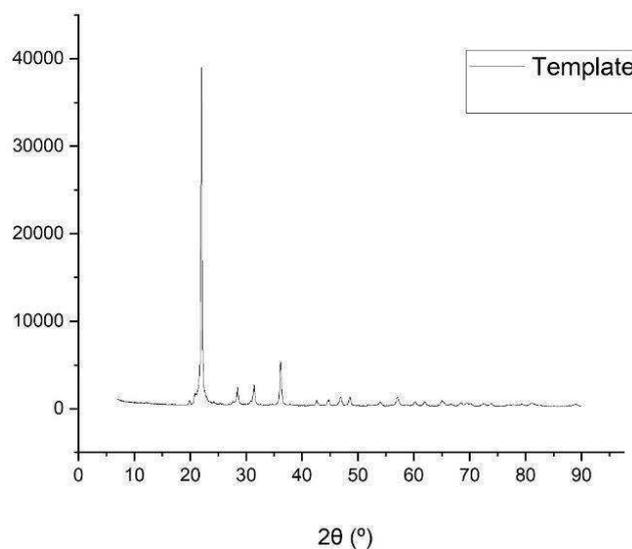


Figura 23: Difratograma para o *Template* obtido de acordo com o item 4 deste trabalho.

O difratograma de raios X do *Template* mostra picos bem definidos entre 20 e 36°, característicos para fosfatos de cálcio, comprovando a formação deste composto como consequência da reação entre os grupos fosfatos ligados às microfibras com os íons Ca^{2+} .

5.6.1. Composição Química do *Template*

A determinação do grau de fosforilação o grau de fosforilação das P-CuF igual a 1×10^{-3} mols de PO_4^{-3} / g de P-CuF, permitiu calcular a quantidade de íons cálcio e sílica necessária para a preparação do *Template* para a formação do biovidro 58S (BG58S) considerando a sua composição 58% SiO_2 , 33% CaO e 9% P_2O_5 (w/w%).

A composição química do *Template* foi determinada por Fluorescência de raios X. O resultado considerando os componentes do biovidro P_2O_5 , CaO e SiO_2 , em percentagem de massa, é mostrado na Tabela 4.

Tabela 4: Composição do *Template*, expressa como P_2O_5 , CaO e SiO_2 , em % m/m dos componentes do *Template*, obtido por FRX após liofilização.

Elemento	Composição
P_2O_5	1,84%
CaO	1,24%
SiO_2	96,51%

Os resultados mostram que as quantidades de P_2O_5 , CaO e SiO_2 são discrepantes da composição do biovidro 58S.

Apesar das quantidades adicionadas de sílica e Ca^{2+} terem sido calculadas a partir do grau de fosforilação das microfibras, 10^{-3} moles de PO_3^{4-} /grama de P-CuP e da composição do biovidro, os resultados de Fluorescência de raios-X fornecem quantidades de P_2O_5 , CaO e SiO_2 muito diferentes da esperada.

Estes resultados, provavelmente, são devidos à perda de Ca^{2+} e talvez fosfato de cálcio que se desprende das microfibras devido à reação com íons Ca^{2+} durante as lavagens e centrifugações sucessivas da dispersão das microfibras em CTAB.

Outra possibilidade é a falta de homogeneidade nas lamelas do biovidro. O processo de preparação do *Template* resulta no “revestimento” das P-CuF+ Ca^{2+} por sílica, o que pode ter resultado na predominância deste material na superfície das lamelas. As análises por FRX preferencialmente detecta a presença da sílica na superfície em detrimento do P_2O_5 e CaO presentes no inferior das lamelas.

No capítulo 2 a seguir serão discutidas estratégias utilizadas para adicionar cálcio e sílica suficiente à dispersão P-CuF+ Ca^{2+} /sílica e, posteriormente, organizá-las para a formação do *Template* e calcina-los para obter o *Scaffold* de biovidro.

**CAPÍTULO II - SÍNTESIS DE SCAFFOLDS DE BIOVIDROS UTILIZANDO OS
*TEMPLATES***

Após a obtenção dos *Templates* como reportado no capítulo I foram realizados estudos de calcinação que permitam a consolidação da rede de sílica juntamente com o fosfato e íons cálcio presentes.

Um dos desafios a serem superados neste trabalho para obtenção de um *Scaffold* com as propriedades de vidro bioativo é a obtenção de uma estrutura vítrea típica de um biovidro e não de uma vitrocerâmica. Embora as vitrocerâmicas originadas da cristalização de biovidros sejam biocompatíveis, quando comparadas com os biovidros, apresentam uma velocidade menor quanto à capacidade de estimular e regenerar o tecido ósseo [10,11,67].

6. SCAFFOLD DE BIOVIDRO

Os vidros bioativos contendo SiO_2 promovem a formação óssea tanto *in vitro* quanto *in vivo*, uma vez que as espécies de silício e íons lixiviados em contato com os fluídos corpóreos podem estimular a proliferação de osteoblastos e a regulação positiva dos genes [68].

Para que os *Scaffolds* de vidros bioativos auxiliem na reestruturação óssea é necessário que, além da composição adequada, eles possuam poros interconectados com tamanho maior que 50 μm , permitindo a invasão celular e permeação de substâncias importantes para a osteogênese.

Devem, também, apresentar área superficial elevada e resistência mecânica para suportar o manuseio durante a cirurgia, permitindo o trabalho do cirurgião e adequando-se ao formato do defeito ósseo sem colapsar os poros, ou alternativamente, preparado na forma de grãos que possam ser depositados no defeito [6,10,46].

Como descrito no Prefácio à estratégia para sintetizar *Scaffold* neste trabalho foi utilizar um *Template* de microfibras de celulose, C_μF . O *Template* foi eliminado por calcinação obtendo-se um *Scaffold* de biovidro com estrutura porosa, e características similares as destacadas acima.

As microfibras de celulose, parte orgânica do *Template*, podem ser removidas através de tratamento térmico a temperaturas superiores a 300 °C [69]. Neste trabalho, foram realizados diversos ensaios de calcinação dos *Templates* em diferentes tempos e temperaturas, como mostra a Tabela 5. Porém as calcinações conduzidas a temperaturas menores que 1100°C, independentes dos tempos de

calcinação e rampa de aquecimento, resultaram em corpos que não apresentavam resistência mecânica e com difícil manuseio, transformando-se facilmente em pós.

Todavia, os *Scaffolds* obtidos a temperaturas de 1100 e 1200°C apresentaram boa resistência mecânica, permitindo o manuseio sem desmantelar em pó.

Os *Scaffolds* preparados por estes processos resultam em estruturas com paredes de poros finas e formados por biovidro, sem que ocorresse a cristalização transformando-o em vitrocerâmicas. Embora as vitrocerâmicas originadas da cristalização de biovidros sejam biocompatíveis, quando comparadas com os biovidros, apresentam uma velocidade menor quanto à capacidade de estimular e regenerar o tecido ósseo [10,11,70].

Na Figura 24 está representada a rede de sílica para um biovidro formada pelos óxidos SiO_2 , CaO e P_2O_5 por ligações múltiplas com os átomos de oxigênio [71].

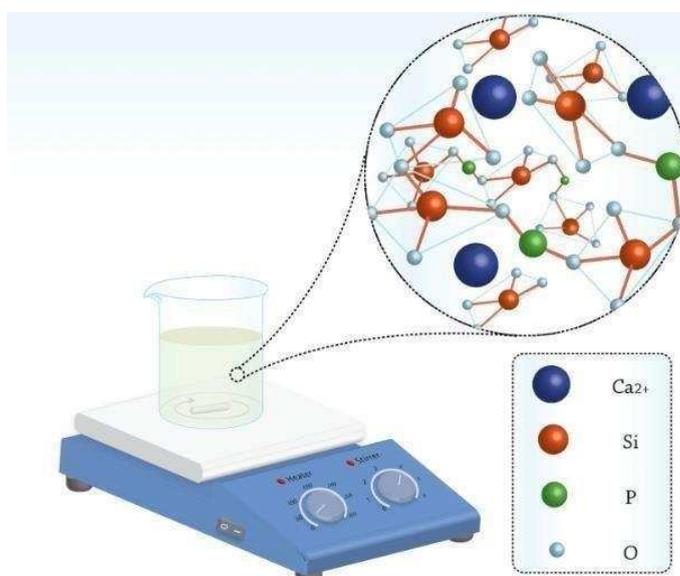


Figura 24: Representação esquemática da rede da sílica do biovidro que representam o precursor do vidro bioativo obtido por sol-gel, após calcinação.

6.1. Procedimento experimental para obtenção do *Scaffold* de biovidro por calcinação

Os *Templates* obtidos no item 3.6 do capítulo I foram calcinados em cadinho de platina no forno mufla *Lindberg Blue M* (Thermo Cientific), a temperaturas entre 600°C e 1200°C com variados valores de rampa de aquecimento e tempos. A

Tabela 5 mostra as temperaturas, tempo e rampa de aquecimento utilizado nos ensaios de calcinação. Para facilitar a escrita, os *Scaffolds* foram nomeados como a sigla BG seguido da temperatura utilizada na calcinação dos mesmos.

Tabela 5: Temperaturas, tempos e rampas de aquecimento utilizados na calcinação dos *Templates*.

<i>Scaffolds</i>	T (°C)	Rampa de aquecimento (°C/min)	T (min)	Observações
BG-600	600	2	15	<i>Scaffold</i> frágil e sem poros
BG-600	600	2	30	<i>Scaffold</i> frágil e sem poros
BG-800	800	2	15	<i>Scaffold</i> frágil e sem poros
BG-1000	1000	8	120	<i>Scaffold</i> frágil
BG-1100	1100	10	60	<i>Scaffold</i> resistente e firme
BG-1200	1200	10	120	<i>Scaffold</i> resistente e firme

Apesar dos *Templates* terem sido calcinados conforme as condições mostradas na tabela 5 apenas os *Scaffolds* obtidos a 1100 e 1200 °C, denominados BG-1100 e BG-1200, apresentaram uma estrutura com maior resistência mecânica e permitindo o manuseio sem desmantelar em pó.

7. CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS DE BIOVIDRO

7.1. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) dos *Scaffolds*

As análises por Microscopia Eletrônica de Varredura foram realizadas com os *Scaffolds*. Os *Scaffolds* foram montados sobre “Stubs” metálicos com fitas de carbono e/ou cola de carbono e metalizadas.

Foram obtidas micrografias de todas as amostras no equipamento *Quanta FEG 250* a uma tensão de aceleração de 2, 5 e 10 kV.

7.2. Difração de raio-X dos *Scaffold*

As análises foram feitas utilizando um difratômetro da marca Shimadzu, modelo XRD7000. Os difratogramas foram obtidos em um intervalo de 2θ de 5° a 100° com uma velocidade de 2° min^{-1} , utilizando alvo de Cu ($1,54 \text{ \AA}$ K α), voltagem de 30 kV e corrente de 10 mA.

Aproximadamente 100 mg das amostras do *Scaffold* foram prensadas em um suporte de vidro com 3 cm de diâmetro e 1 mm de profundidade.

7.3. Fluorescências de raios-X

As análises de composição química dos *Scaffolds* foram determinadas por Fluorescência de raios-X utilizando o equipamento micro-EDX 1300 (Shimadzu).

As amostras de *Scaffolds* foram analisadas também em forma de pastilhas puras, sem adição de solvente ou agregante, com 1 cm de diâmetro e 2 mm de espessura. Utilizando o equipamento XRF1800.

As medidas foram realizadas pelo tempo de 300 s em 4 faixas de aquisição de 0 a 20 KeV e faixa de análise de 0,00 a 20,00 KeV.

7.4. Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos *Scaffolds* de biovidro

As amostras de *Scaffolds* foram analisadas por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) em um espectrofotômetro Agilent

Techonologies Cary 630 (Agilent) equipado com uma unidade de Transmitância. O espectro foi obtido na faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

As amostras foram preparadas na forma de pastilhas a 1% em KBr. O KBr utilizado para a análise de transmitância foi seco na Mufla *EDG 3P-S* durante 3 horas a 300°C.

8. RESULTADOS E DISCUSSÕES

8.1. Estrutura dos *Scaffolds* de biovidro

Na Figura 25 são mostradas as micrografias dos *Scaffolds* de biovidro. As imagens A e B exibem os *Scaffolds* BG-1200 e as imagens C e D exibem os *Scaffolds* BG-1100.

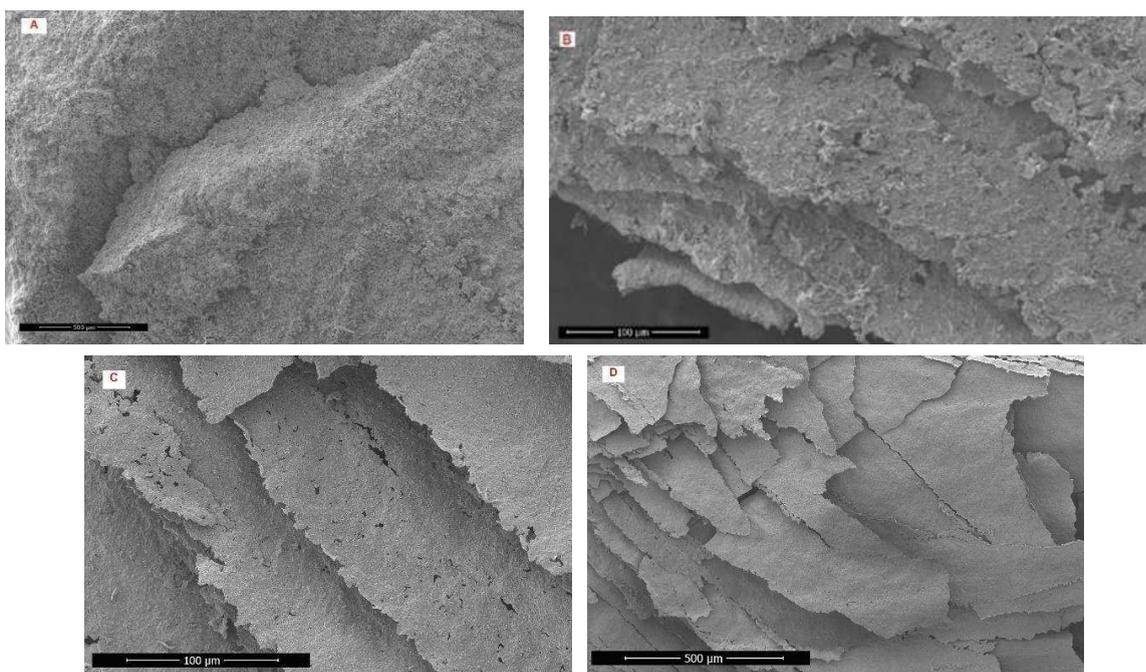


Figura 25: Micrografias dos *Scaffolds* em 1100 e 1200°C em diferentes aumentos. A) e B) Correspondem as micrografias do *Scaffold* calcinados a 1200°C. C) e D) Correspondem as micrografias do *Scaffold* calcinados a 1100°C.

Analisando as imagens A e B percebe-se que os *Scaffolds* calcinados a 1200 °C ficaram muito compactos, sem espaço entre as lamelas e apresentam paredes mais espessas, com lâminas menos visíveis. Esses aspectos, possivelmente, inviabilizariam o uso destes *Scaffolds*, pois não há poros com dimensões apropriadas, e tão pouco a organização esperada para este material.

Por outro lado, as imagens C e D mostram uma estrutura lamelar acentuada com espaçamento de 50 a 100 μm entre elas, assim como paredes finas, possibilitando o uso do *Scaffold* por apresentar espaçamento suficiente para invasão celular e permeação dos fluidos corpóreos.

A queima das microfibras de celulose durante a calcinação do *Template* tem duas funções que resultam na formação do *Scaffold* com as características observadas na Figura 25:

- A primeira é atuar como molde para o *Scaffold*: As microfibras de celulose, ao se organizarem através da centrifugação e congelamento vertical seguido de liofilização, contendo os grupos Fosfatos ligado aos íons Ca^{2+} e a sílica adsorvida formam um “molde” que é copiado por estes compostos e que se mantêm durante a eliminação pela queima durante a calcinação.
- A segunda função deve-se ao processo de queima: Ao entrar em combustão, as microfibras de celulose, promovem um rápido aumento da temperatura local que resulta na aglutinação e formação de um sólido formado pelos óxidos que são típicos componentes presente na rede vítrea, SiO_2 , P_2O_5 e CaO , impedindo que a estrutura copiada desmorone.

A Figura 26 mostra uma foto do *Scaffold* BG1100. O *Scaffold* apresentou resistência mecânica suficiente para ser manuseado não se desfazendo em pó. A comparação com o tamanho do *Template*, Figura 21, mostra que houve uma retração uniforme em seu tamanho, porém as formas do Tubo Falcon usado para preparar o *Template* foram mantidas.

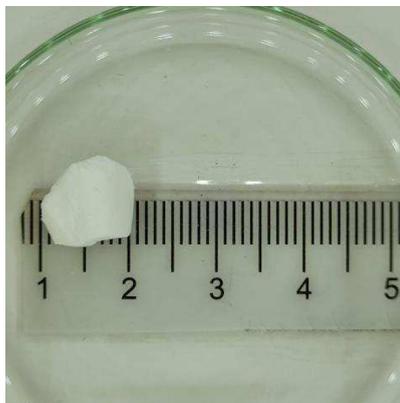


Figura 26: BG-1100 calcinado à 1100°C . Visivelmente nota-se a ‘diminuição’ de tamanho em comparação a **Figura 21** que é o *Template* que deu origem ao biovidro.

8.2. Difração de raios-X do *Scaffold* de biovidro

Os biovidros apresentam uma estrutura descrita por uma rede de sílica sem simetria e/ou periodicidade. Assim, a ausência de cristalinidade é um fator importante a ser investigado neste trabalho, como já mencionado, pois a cristalinidade indicaria a formação de uma vitrocerâmica.

A Figura 27 mostra o difratograma de raios X para o biovidro BG-1100.

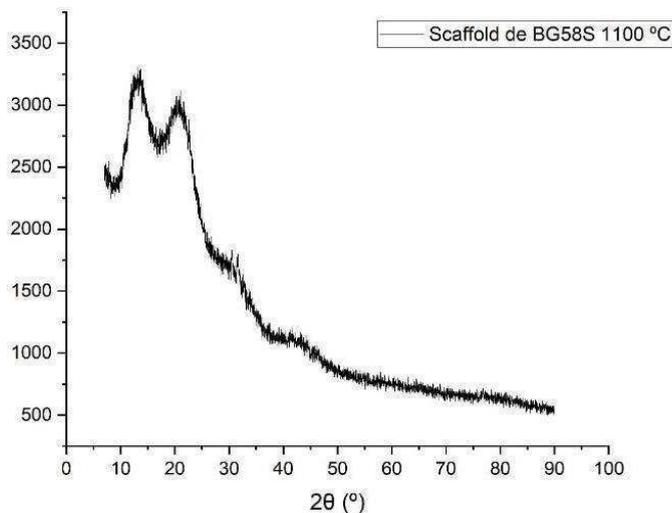


Figura 27: Difratograma de raios-x para o *Scaffold* BG-1100.

O difratograma mostrado na Figura 27 indica a natureza não cristalina do *Scaffold* pela presença de halo característico destes materiais e pela intensidade reduzida. No entanto, os picos largos e também pouco intensos em 15° e 23° em 2θ podem indicar o início de um processo de nucleação [67].

8.3. Composição química do *Scaffold* BG-1100

A composição química dos *Scaffolds* de biovidro BG-1100 foi analisada por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Fluorescência de raios-X (FRX). Para iniciar os resultados de composição química para o BG-1100 foi realizado análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). A Figura 28 mostra os espectros de transmitância de FTIR das amostras para a estrutura do *Scaffold* de biovidro BG-1100 e, como comparação, o do *Template*.

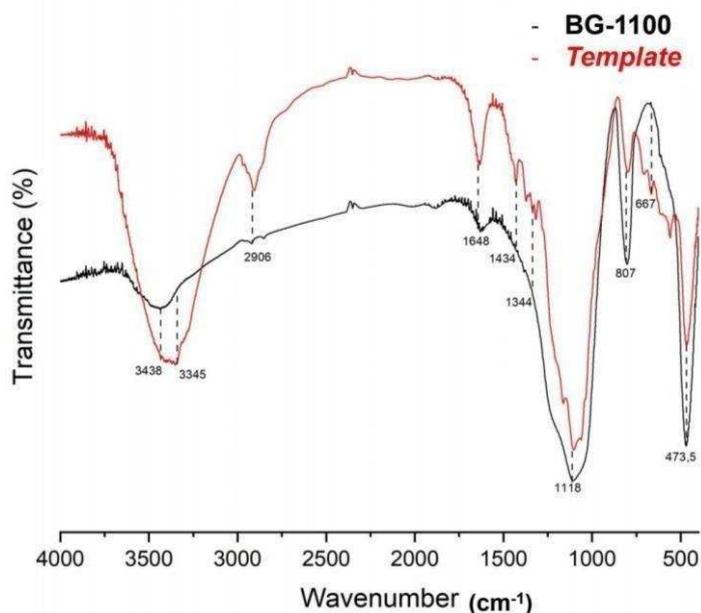


Figura 28: Espectro no Infravermelho do módulo de Transmitância para BG-1100 em preto. Para comparação é mostrado também, em vermelho, o espectro obtido para o *Template* que deu origem ao biovidro.

Os picos intensos e largos em 3438 e 3345 cm^{-1} estão relacionados à vibração de alongamento dos grupos-OH. Ele é menos intenso e largo no *BG-1100* devido à condensação dos grupos OH na calcinação e mais definido no *Template* devido à presença de grupos silanóis formados pela hidrólise de TEOS [72].

As bandas entre 1648 e 1344 cm^{-1} corresponde à vibração de flexão O-H dos grupos hidroxila que está presente em ambos os materiais, mas devido à calcinação no BG-1100 esse grupo sofre condensação na matriz do vidro, tornando-se menos intenso em 1648 cm^{-1} e não mais presente em 1344 cm^{-1} [73].

As bandas de absorção em torno de 473 , 807 e 1118 cm^{-1} são as principais bandas de absorção atribuídas ligações Si-O correspondendo aos modos de estiramento e estiramento simétrico da ligação Si - O - Si, respectivamente. Pois, a sílica está presente em ambos os materiais, mas as ligações Si-OH do *Template* passam a ser Si-O-Si devido a condensação resultante da calcinação, causando o aumento de intensidade do pico no BG-1100 [73].

A banda dupla em torno de 667 cm^{-1} mostra que o material possui fosfato de cálcio, pois o pico representa a vibração de flexão P-O do PO_4 que é visivelmente mais definida no BG-1100 [74,75].

A composição Química do vidro que forma o *Scaffold* BG-1100 foi determinada por Fluorescência de raios X. A Tabela 6 mostra o resultado expresso

em função dos componentes P_2O_5 , CaO e SiO_2 que formam a rede do vidro.

Tabela 6: Resultados das porcentagens em massa (% m/m) dos componentes do biovidro que forma o *Scaffold* BG-1100 expressos como P_2O_5 , CaO e SiO_2 , obtidos por FRX.

<i>Elemento</i>	<i>Composição (%m/m)</i>
P_2O_5	0,90 %
CaO	0,75 %
SiO_2	98,35 %

Os resultados mostrados na Tabela 6 diferem muito da composição esperada para o biovidro 58S: SiO_2 58%, CaO 33% e P_2O_5 9% apesar da preparação do *Template* ter considerado o grau de fosforilação das P-CuF, para o cálculo das quantidades de íons Ca^{2+} e de TEOS para a formação de sílica.

Este resultado discrepante é, provavelmente, devido à perda de Ca^{2+} e de fosfato ligado a ele, durante as lavagens e centrifugações sucessivas da dispersão das microfibras no processo de preparação do *Template*.

Sendo assim, este capítulo terá uma etapa complementar denominada “**Ajuste da composição dos *Scaffolds* de Biovidro**” que não estava prevista originalmente.

9. AJUSTE DA COMPOSIÇÃO DOS SCAFFOLDS DE BIOVIDRO

Para resolver a discrepância entre a composição do BG-1100 em relação à composição do biovidro 58S, foram experimentados dois procedimentos para a adição de cálcio e sílica durante a preparação do *Template*. Os dois procedimentos procuraram evitar a possível perda de cálcio e adequar a adsorção de sílica no *Template*. Para os dois procedimentos, as quantidades de íons Ca^{2+} e TEOS adicionados à suspensão de microfibras fosforiladas, foi calculada estequiometricamente a partir do grau de fosforilação.

9.1. Metodologias da adição de íons cálcio e sílica à dispersão

R1 - Adição de Cálcio como carbonato de cálcio e sílica como TEOS à suspensão de microfibras fosforiladas e previamente reagidas com íons Ca^{2+} :

A partir da massa de microfibras de celulose fosforiladas e reagidas com íons Ca^{2+} e dispersas em solução de CTAB e TEOS em pH=10 foi adicionada uma dispersão de carbonato de cálcio.

As quantidades de carbonato de cálcio e de TEOS adicionadas à dispersão das microfibras fosforiladas e previamente reagidas com íons Ca^{2+} foram calculadas a partir da quantidade de fosfato ligado as microfibras fosforiladas.

Após a hidrólise do TEOS a dispersão resultante com carbonato de cálcio ficou em agitação por 60 min, foi centrifugada e o sólido resultante submetido ao processo de congelamento vertical e liofilização, para a formação do *Template*.

R2 - Adição de Cálcio como íons Ca^{2+} e sílica como TEOS, à suspensão de microfibras fosforiladas seguida da precipitação dos íons Ca^{2+} pela adição de carbonato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$:

A partir da massa de microfibras fosforiladas dispersas em solução de CTAB em pH 10 foi adicionado solução de íons Ca^{2+} e TEOS.

As quantidades de íons Ca^{2+} e de TEOS foram calculadas a partir da quantidade de fosfato ligado as microfibras fosforiladas. A seguir adicionou-se à

dispersão e sob agitação, Carbonato de Amônio sólido e em pequenas adições e em quantidade estequiométrica para precipitar “*in loco*” os íons Ca^{2+} como Carbonato de Cálcio. Durante as adições o PH=10 foi mantido pela adição de solução de hidróxido de amônio.

Após hidrólise do TEOS a dispersão final foi centrifugada, e o sólido resultante foi submetido ao processo de congelamento vertical e liofilização, para a formação do *Template*.

10. CARATERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS DE BIOVIDRO APÓS A CORREÇÃO DE COMPOSIÇÃO

10.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

As análises realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura dos *Templates* liofilizados e *Scaffolds* de biovidro BG1100 com adição de cálcio, onde, as amostras foram preparadas sobre “Stubs” metálicos que estava revestido com fitas de carbono e cola de lítio e metalizadas com ouro (AU).

As superfícies foram observadas pelo equipamento Leo Electron Microscopy/ Oxford (Leo 440i) a uma tensão de aceleração de 10 kV e corrente de 50 A.

10.2. Fluorescências de raios-X

As análises de composição química dos *Templates* e *Scaffolds* foram determinadas por Fluorescência de raios-x utilizando o equipamento micro-EDX 1300 (Shimadzu).

As amostras de *Scaffolds* foram analisadas também em foram de pastilhas puras, sem adição de solvente ou agregante, com 1 cm de diâmetro e 2 mm de espessura.

As medidas foram realizadas com faixa de análise entre 0,00 e 20,00 KeV.

11. RESULTADOS E DISCUSSÃO

11.1. Composição química dos *Scaffolds* de biovidro BG1100 preparados pela rota R1 e R2

A composição química dos *Templates* e *Scaffolds* de biovidro que sofreram adição de cálcio e sílica foi analisada por Fluorescência de raios-X (FRX), por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).

Para todas as amostras mostradas na Tabela 7 a análise por FRX foi executada utilizando o método que trabalha com o canal de leitura de sódio a urânio (Na-U), com tempo de aquisição de 200 s. Cada amostra foi analisada em 2 pontos diferentes e cada área de análise foi 50 microns.

Tabela 7: Composição Química em % m/m determinada por FRX para o *Template* e *Scaffold* BG-1100 obtidos pela rota R1. Média para 2 pontos distintos na amostra.

AMOSTRA	SiO ₂	CaO	P ₂ O ₅
TEMPLATE (R1)	21,43	16,61	-
BG-1100 (R1)	83,40	16,58	-

Os Resultados de FRX para o *Template* (R1) e para o *Scaffold* BG-1100 (R1) mostraram ausência do sinal de Fósforo (P₂O₅). Apesar dos valores percentagem de SiO₂ e CaO terem se ajustados para valores mais próximos dos esperados para o BG58S, em comparação como os resultados obtidos para o *Template* e *Scaffold* obtidos para a síntese sem ajuste de composição, a ausência de fósforo chama atenção. Além do resultado inesperado para a ausência de P₂O₅ a análise indicou também a presença do elemento cloro no material, apesar de não haver a adição de nenhum reagente com este elemento (*Template* = 78,1% de Cl). Outro fato incomum foi que a análise de FRX para o *Scaffold* BG-1100 (R1) não indicou a presença do elemento Cl, apesar do *Scaffold* ter sido obtido a partir do *Template*.

A Tabela 8 mostra os resultados obtidos para análise de FRX para os

Templates e BG-1100 (R2).

Tabela 8: Composição Química em porcentagem de massa (% m/m) determinada por FRX para o BG-1100 obtidos com adição de íons cálcio pela rota R2, média de 2 pontos distintos na amostra.

AMOSTRA	SiO ₂	CaO	P ₂ O ₅
TEMPLATE (R2)	2,53	60,25	10,7
BG-1100 (R2)	3,23	69,93	26,82

Apesar de termos todos os componentes presentes, as proporções entre eles continuam discrepantes em relação ao esperado para o biovidro 58S e com uma drástica diminuição da quantidade de sílica.

As hipóteses para justificar esta perda de sílica são: A sílica pode ter sido perdida no sobrenadante na centrifugação realizada após a adição de todos os componentes usados na correção (solução de Ca²⁺, carbonato de amônio e TEOS) ou o tempo de hidrólise foi insuficiente para a completa transformação do TEOS em sílica. Apesar da discrepância na quantidade de sílica, a razão entre CaO e P₂O₅: $70 \text{ CaO} / 27 \text{ P}_2\text{O}_5 = 3,2$ é próxima da mesma razão para o BG 58S: $33 \text{ CaO} / 9 \text{ P}_2\text{O}_5 = 3,6$.

11.2. Estrutura dos *Scaffolds* de biovidro 58S com adição de íons cálcio

O *Template* e o *Scaffold* BG-1100 (R2) foram caracterizados por SEM e a Figura 29 mostra as micrografias correspondentes.

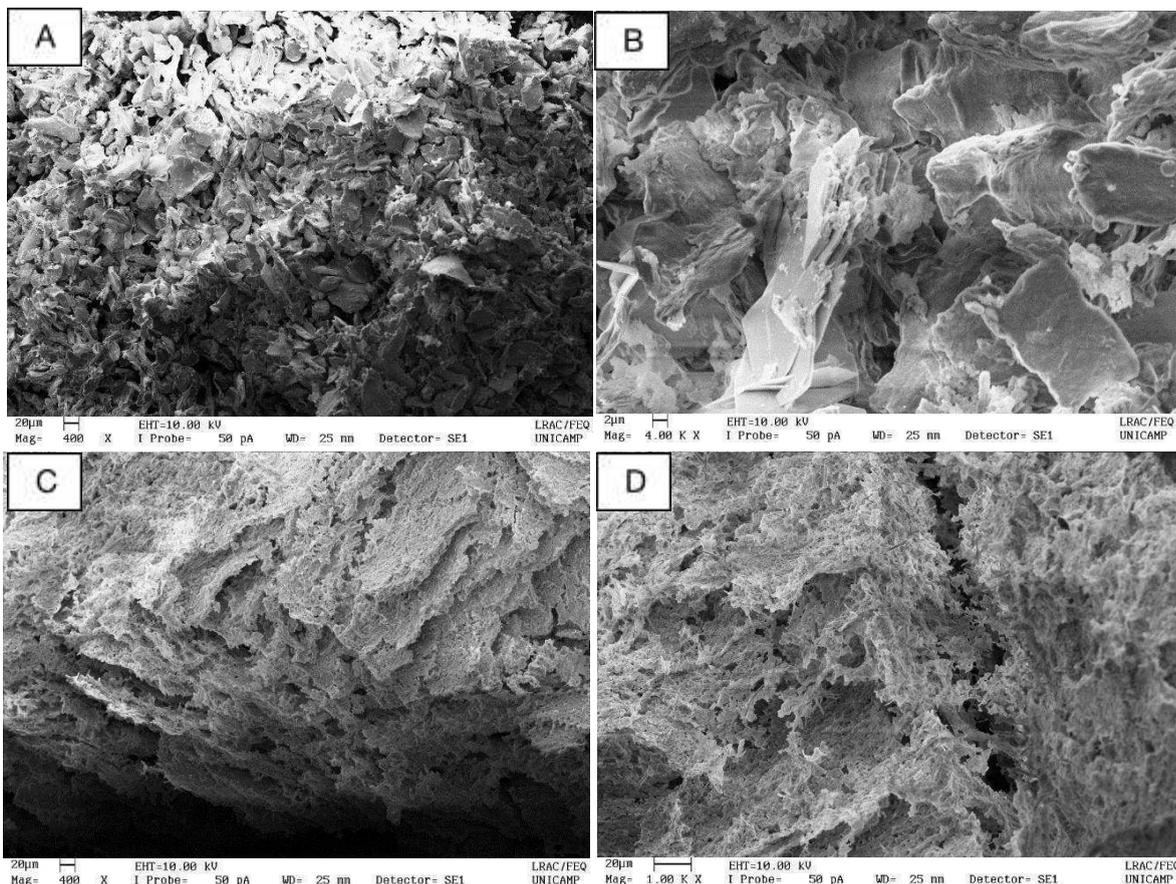


Figura 29: Micrografias do *Template* e *Scaffolds* BG-1100 (R2) em diferentes aumentos. A) e B) Correspondem as micrografias do *Template*. C) e D) Correspondem às micrografias do *Scaffold*.

Analisando as imagens A e B percebe-se que o *Template* possui áreas que exibem o arranjo das microfibras. Mas nota-se, principalmente, a deposição de material inorgânico sobre todo o *Template*, indicada pela “*Coloração Branca da Micrografia*” típica de imagens que carregam ao ser exposta ao feixe de elétrons do Microscópio Eletrônico de Varredura, característico da presença de depósito de material inorgânico, sugerindo a deposição de carbonato de cálcio sobre a amostra.

Por outro lado, as imagens C e D correspondentes ao *Scaffold* BG-1100 (R2), apresentam a estrutura lamelar observada nos *Scaffolds* sem correção de composição. Porém, as lamelas possuem pouco espaço entre elas e com paredes espessas. Esta morfologia deve-se provavelmente pela presença de CaO formado

na calcinação e pela quantidade diminuta de sílica em relação aos *Scaffolds obtidos sem ajuste de composição*. A sílica presente em maior quantidade recobria melhor a estrutura lamelar do *Template*, preservando melhor a estrutura lamelar obtida na preparação do *Template e do Scaffold*.

CONCLUSÕES

A estratégia adotada para realização do trabalho: obtenção das microfibras de celulose, seguida da funcionalização com grupos fosfatos, fixação de íons cálcio, adsorção de sílica pela modificação do potencial zeta com o uso de um surfactante catiônico, e a organização por centrifugação controlada e congelamento seguido de liofilização das dispersões deste material, representa um novo caminho para a formação de estruturas porosas a partir de materiais celulósicos e se mostrou muito adequada para a construção de *Templates*.

A calcinação dos *Templates* deu origem a *Scaffolds* com características vítreas e com morfologia lamelar adequada para invasão celular e permeação dos fluídos corpóreos, que representavam desafios deste trabalho.

Para sobrepujar o outro desafio deste trabalho, obter o biovidro 58S como material constituinte dos *Scaffolds*, será necessário ajustar as condições de síntese que possam evitar a possível perda dos componentes do 58S, assim como, prevenir a possível falta de homogeneidade das lamelas que formam os *Scaffolds*.

As correções de na rota de síntese para obter a composição do biovidro 58S, realizadas na parte final do trabalho, se mostraram promissoras e resultaram em valores mais próximos do esperado.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Investigar rotas de síntese que permite obter *Scaffolds* com composição do Biovidro 58S.

REFERÊNCIAS

- 1 Oliveira L. S. A. F., Oliveira C. S., Machado A. P. L., Rosa F. P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras, *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* 2010, 9, 37-44.
- 2 Yousefi A.-M, Oudadesse H., Akbarzadeh R., Wers E., Lucas-Girot A. Physical and biological characteristics of nanohydroxyapatite and bioactive glasses used for bone tissue engineering, *Nanotechnology Reviews* 2014, 6, 527-552.
- 3 Clark A. E., Pantano C.G., Hench L.L. Auger Spectroscopic Analysis Of Bioglass Corrosion Films, *Journal of the American Ceramic Society* 1976, 37, 59.
- 4 Gerhardt L., Boccaccini A. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Materials* 2010, 3, 3867- 3910.
- 5 Baino, Francesco et al. Bioactive glass and glass-ceramic orbital implants. *International Journal Of Applied Ceramic Technology* 2019, 16, 1850-1863.
- 6 Fu, Q. Bioactive Glass Scaffolds for Bone Tissue Engineering. Biomedical, Therapeutic and Clinical Applications of Bioactive Glasses. Woodhead, *Publishing Series in Biomaterial* 2019, 417– 442.
- 7 Mohammadreza Haftbaradaran-Esfahani, Mehdi Ahmadian, Amir Hossein Nassajpour-Esfahani. Fabrication and characterization of porous biomedical Vitalliumalloy with 58S bioglass coating prepared by sol-gel method, *Applied Surface Science* 2020, 506, 0169-4332.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144959>.
- 8 Mohammad Hosein Haddadi, Ebrahim Karamian, Hamid Reza Bakhsheshi-Rad, Masoud Kasiri-Asgarani. Investigation of the effect of Bioglass-58S content on structural and biological properties of PCL-chitosan-58S-bioactive glass compositecoating for bone tissue

- engineering application, *Ceramics International* 2023, 49, 8190-8195.
- 9 G.S. Polymeris, V. Giannoulatou, A. Kyriakidou, I.K. Sfampa, G.S. Theodorou, E. Şahiner, N. Meriç, G. Kitis, K.M. Paraskevopoulos. Bioactivity characterization of 45S5 bioglass using TL, OSL and EPR: Comparison with the case of 58S sol- gel bioactive glass, *Materials Science and Engineering: C* 2017, 70, 673-680. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.051>.
 - 10 Fu, Q., Saiz, E., Rahaman, M. N., Tomsia, A. P. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2011, 31, 1245–1256.
 - 11 Hench, Larry L.; Vasconcelos, Wander. Gel-Silica Science. *Annual Review, Materials Science* 1990, 20, 269-98.
 - 12 Souza, Marina Trevelin. *Desenvolvimento e caracterização de tecidos vítreos flexíveis altamente bioativos*. 2015 218f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos.
 - 13 Hang Zhang, Yinze Xiong, Lanlan Dong, Yifan Shen, *et al.* Microstructural, mechanical properties and strengthening mechanism of DLP produced β -tricalciumphosphate scaffolds by incorporation of MgO/Zn O/58S bioglass. *Ceramics International* 2021, 47, 25863- 25874. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.05.317>.
 - 14 Ma, H., Feng, C., Chang, J. e Wu, C. 3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy, *Acta Biomaterialia* 2012, 79, 37-59. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.026>.
 - 15 Francesco Baino, Juliana Marchi, Roger Borges, Enrica Verné. Holmium-doped 58S glass-derived foam-like scaffolds, *Materials Letters* 2023, 341, 134256. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2023.134256>.

- 16 Amit Kumar, Kartikeya Dixit, Niraj Sinha. Fabrication and characterization of additively manufactured CNT-bioglass composite scaffolds coated with cellulose nanowhiskers for bone tissue engineering, *Ceramics International* 2023,49, 17639- 17649. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.02.130>.
- 17 Sofiah, AGN; Pasupuleti, J.; Samykano, M.; et al. Harnessing Nature's Ingenuity:A Comprehensive Exploration of Nanocellulose from Production to Cutting-Edge Applications in Engineering and Sciences, *Polymers* 2023, 15, 30- 44. <https://doi.org/10.20944/preprints202305.2196.v1>.
- 18 Rasaq S. Abolore, Swarna Jaiswal, Amit K. Jaiswal. Green and sustainable pretreatment methods for cellulose extraction from lignocellulosic biomass and its applications: A review, *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 2024, 7. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100396>.
- 19 C Jaya Verma, Michal Petru, Saurav Goel. Cellulose based materials to accelerate the transition towards sustainability, *Industrial Crops and Products* 2024, 210. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118078>.
- 20 D Mohsin Raza, Jawad Mustafa, Ali Hassan Al-Marzouqi, Basim Abu-Jdayil. Isolation and characterization of cellulose from date palm waste using rejected brine solution, *International Journal of Thermofluids* 2024, 21. <https://doi.org/10.1016/j.ijft.2023.100548>.
- 21 Krivokapić, J., Ivanović, J., Djuriš, J. et al. Tableting properties of microcrystalline cellulose obtained from wheat straw measured with a single punchbench top tablet press, *Saudi Pharmaceutical Journal* 2020, 28, 6, 710-718. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.04.013>.
- 22 Hernández-Becerra, E.; Osorio, M., Marín, D. et al. Isolation of cellulose microfibrils and nanofibrils by mechanical fibrillation in a water-free solvent, *Cellulose* 2023, 30, 4905–4923. <https://doi.org/10.1007/s10570-023-05162-3>.
- 23 D'Orsi, R., Canale, V. C., Cancelliere, R., Omar, O. H. et al. Tailoring the

- Chemical Structure of Cellulose Nanocrystals by Amine Functionalization, *European Journal of Organic Chemistry* 2023, 26, 52-60.
<https://doi.org/10.1002/ejoc.202201457>.
- 24 Annamalai, P. K., Nanjundan, A. K., Dubal, D. P., Baek, J.-B. An Overview of Cellulose-Based Nanogenerators, *Adv. Mater. Technol.* 2021, 6.
<https://doi.org/10.1002/admt.202001164>.
- 25 Anass, A. B., Abdelghani, B., Zineb, K., et al. Application of UF adhesives containing unmodified and phosphate-modified cellulose microfibrils in the manufacturing of particleboard composites, *Industrial Crops and Products* 2022, 176. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114318>.
- 26 Khalili, H., Bahloul, A., Ablouh, E.-H., et al. Starch biocomposites based on cellulose microfibrils and nanocrystals extracted from alfa fibers, *International Journal of Biological Macromolecules* 2023, 226, 345-356.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.313>.
- 27 Ludueña, L.N., Vecchio, A., Stefani, P.M. et al. Extraction of cellulose nanowhiskers from natural fibers and agricultural byproducts, *Fibers Polym* 2013, 14, 1118–1127. <https://doi.org/10.1007/s12221-013-1118-z>.
- 28 Zambrano-Mite, L. F., Villasana, Y., Bejarano, M. L., et al. Optimization of microfibrillated cellulose isolation from cocoa pod husk via mild oxalic acid hydrolysis: A response surface methodology approach, *Heliyon* 2023, 9.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17258>.
- 29 Bahloul, A., Kassab, Z., Bouchti, M. E., et al. Micro- and nano- structures of cellulose from eggplant plant (*Solanum melongena* L) agricultural residue, *Carbohydrate Polymers* 2021, 253.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117311>.
- 30 Bangar, S. P., Whiteside, W. S., Kajla, P., Tavassoli M. Value addition of rice

- straw cellulose fibers as a reinforcer in packaging applications, *International Journal of Biological Macromolecules* 2023, 243.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125320>.
- 31 Yuuki, H., Sumiyo, H., Yuta, S., et al. Nanospiked paper: Microfibrous cellulose materials nanostructured via partial hydrolysis and self-assembly, *Carbohydrate Polymers* 2023, 300.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120257>.
- 32 Campos, A. P. Alternativas de uma fibra vegetal. *Pesquisa FAPESP* 2017, 253, 70-73.
- 33 Yogesh, K., Dharmesh, H., Chinmay, H., et al. Cellulose bionanocomposites for sustainable planet and people: A global snapshot of preparation, properties, and applications, *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 2021, 2. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100065>.
- 34 Muthukumaran, P., Babu, P. S., Shyamalagowri, S., et al. Polymeric biomolecules based nanomaterials: Production strategies and pollutant mitigation as an emerging tool for environmental application, *Chemosphere* 2022, 307. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136008>.
- 35 Hou, G., Zhao, S., Peng, L. et al. A systematic study for the structures and properties of phosphorylated pulp fibers prepared under various conditions, *Cellulose* 2022, 29, 7365– 7376. <https://doi.org/10.1007/s10570-022-04713-4>.
- 36 Green D. L., Lin J. S., Lam Y. F., Hu M., Schaefer D. W., Harris M. T. Size, volume fraction, and nucleation of Stober silica nanoparticles, *Journal of Colloid and Interface Science* 2003, 266, 346- 358.
- 37 Brinatti C., Huang J., Berry R. M., Tam K. C., Loh W. Structural and Energetic Studies on the Interaction of Cationic Surfactants and Cellulose, *Nanocrystals Langmuir*. 2016, 32: 689-698.

- 38 Asefa T., MacLachlan M. J., Ozin G. A. Periodic mesoporous organosilicas with organic groups inside the channel walls, *Nature*. 1999, 402: 867-871.
- 39 Júnior A. J. A., Baldo J. B. The Behavior of Zeta Potential of Silica Suspensions, *New Journal of Glass and Ceramics* 2014, 4, 29-37.
- 40 Fu G., He A., Jin Y., Cheng Q., Song J. Fabrication of Hollow silica nanorods using nanocrystalline cellulose as templates, *Bioresources* 2012, 7, 2319-2329.
- 41 Rezwan K., Chen Q. Z., Blaker J. J., Baccaccini A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 2006, 27, 3413–3431.
- 42 Lopes J. H. *Biovidros derivados do 45S5: Os efeitos do Nb2O5 ou da modificação da superfície com Ca²⁺ sobre a estrutura e bioatividade* 2015 447f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- 43 Roman M., Winter W. T. Effect of Sulfate Groups from Sulfuric Acid Hydrolysis on the Thermal Degradation Behavior of Bacterial Cellulose, *Biomacromolecules* 2004, 5, 1671- 1677.
- 44 Shopsowitz K. E., Hamd W. Y., MacLachlan M. J. Flexible and Iridescent Chiral Nematic Mesoporous Organosilica Films, *Journal of the American Chemical Society* 2012, 134, 867–870.
- 45 Shopsowitz K. E., Qi H., Hamda W. Y., MacLachlan M. J. Free- standing mesoporous silica films with tunable chiral nematic structures, *Nature* 2010, 468, 422- 426.
- 46 Aguiar A. E., Silva M. O., Longo B. Ch., Gonçalves M. C., Bertran C. A. Tailoring scaffold porosity for tissue regeneration, *JSM Regenerative Medicine & Bioengineering* 2017, 5, 1021.

- 47 Zahra M., Håvard J., Dagnija L., et al. Review on the strategies to improve the mechanical strength of highly porous bone bioceramic scaffolds, *Journal of the European Ceramic Society* 2024, 44, 23-42.
<https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2023.09.00>.
- 48 Pragyana A., Smita M., Sanjay K. A review on bioactive glass, its modifications and applications in healthcare sectors, *Journal of Non-Crystalline Solids* 2023, 614, 122404. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2023.122404>.
- 49 Espinosa, S. C., Kuhnt, T., Foster, E. J., Weder, C. Isolation of Thermally Stable Cellulose Nanocrystals by Phosphoric Acid Hydrolysis, *Biomacromolecules* 2013, 14, 1223–1230. <https://doi.org/10.1021/bm400219u>.
- 50 Mucalo, M. R., Kato, K., & Yokogawa, Y. Phosphorylated, cellulose-based substrates as potential adsorbents for bone morphogenetic proteins in biomedical applications, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2019, 71, 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.01.004>.
- 51 Xiang, Q., Lee, YY, Pettersson, PO et al. Aspectos heterogêneos da hidrólise ácida da α -celulose, *Appl Biochem Biotechnol* 2003, 107, 505-514.
<https://doi.org/10.1385/ABAB:107:1-3:505>.
- 52 Said, H. A., Bourhim, I. A., Ouarga, A., et al. Sustainable phosphorylated microcrystalline cellulose toward enhanced removal performance of methylene blue, *International Journal of Biological Macromolecules* 2023, 225, 1107-1118. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.172>.
- 53 Granja, P. L., Pouysegue, L., Petraud, M., et al. Cellulose phosphates as biomaterials. I. Synthesis and characterization of highly phosphorylated cellulose gels, *J Appl Polym Sci* 2001, 82, 3341-3353.
<https://doi.org/10.1002/app.2193>.
- 54 Chen Yang, Yaqin Zhu, Zhiwei Tian, et al. Preparation of nanocellulose and its

- applications in wound dressing: A review, *International Journal of Biological Macromolecules* 2024, 254, 0141-8130.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127997>.
- 55 Fatima-Zahra S., Anass, A. B., Khadija, E. B., et al. Thermo- compression process- mediated in-situ cellulose microfibrils phosphorylation enable high performant cellulosic paper packaging, *Chemical Engineering Journal* 2023, 473. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.145268>.
- 56 Messa, L. L., Faez, R., Hsieh Y. Phosphorylated cellulose nanofibrils from sugarcane bagasse with pH tunable gelation, *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 2021, 2:2666-8939.
<https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100085>.
- 57 Canet, Daniel e D. Canet. *Ressonância magnética nuclear: conceitos e métodos*. Chichester: Wiley, 1996.
- 58 Shi Y, Belosinschi D, Brouillette F, Belfkira A, Chabot B. Phosphorylation of Kraft fibers with phosphate esters, *Carbohydr Polym* 2014, 106, 121-7.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.070>.
- 59 Cade-Menun, B. J. Characterizing phosphorus in environmental and agricultural samples by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Talanta* 2005, 66, 359-371. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.12.024>.
- 60 Nagalakshmaiah, M., Kissi N. E., Mortha, G., Dufresne, A. Structural investigation of cellulose nanocrystals extracted from chili leftover and their reinforcement in cariflex-IR rubber latex, *Carbohydrate Polymers* 2016, 136, 945– 95. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.096>.
- 61 Fiss, B. G., Hatherly, L., Stein, R. S., et al. Mechanochemical Phosphorylation of Polymers and Synthesis of Flame-Retardant Cellulose Nanocrystals, *ACS Sustainable Chem. Eng* 2019, 7: 7951–7959.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b00764>.

62 Sang, Y., Prakash, O., Seib, P. A. Characterization of phosphorylated cross-linked resistant starch by ^{31}P nuclear magnetic resonance (^{31}P NMR), *Carbohydrate Polymers* 2007, 67, 201-212.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.05.009>.

63 Bairo, Francesco, et al. Bioactive glass and glass-ceramic orbital implants, *International Journal Of Applied Ceramic Technology* 2019, 16, 1850-1863.
<http://dx.doi.org/10.1111/ijac.13236>.

64 Wang, Z. H., Tammela, P., Strømme, M., Nyholm, L. Cellulose- based Supercapacitors: Material and Performance Considerations, *Adv. Energy Mater* 2017, 7. <http://dx.doi.org/10.1002/aenm.201700130>.

65 Stöber, W., Fink, A., Bohn, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, *Journal of Colloid and Interface Science* 1967, 26, 62-69.

66 Guimarães, F. B. A. P., Barrioni, B. R., Oliveira, A. C. X., Oliveira, A. A. R., & Pereira, M. M. Sol-gel synthesis of porous bioactive glass scaffolds with addition of porogenic agent, *Cerâmica*, 2016, 62, 328–337.

67 Tavares, Dos S., Castro, Lde O., Soares, GD., Alves, GG., Granjeiro, JM. Synthesis and cytotoxicity evaluation of granular magnesium substituted β -tricalcium phosphate, *J Appl Oral Sci*, 2013, 21, 1, 37-42.
<http://dx.doi.org/10.1590/1678-7757201302138>.

68 Zheng K., Boccaccini A. R. Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review, *Advances in Colloid and Interface Science* 2017, 249: 363–373.

69 Bui, X., Dang, H. Bioactive glass 58S prepared using an innovation sol-gel process, *Processing and Application of Ceramics* 2019, 13. 98-103.
<http://dx.doi.org/10.2298/PAC1901098B>.

- 70 Ashok, A., Kumar, A. & Tarlochan, F. Preparation of Nanoparticles via Cellulose- Assisted Combustion Synthesis. *Int. J Self-Propag. High-Temp. Synth.* 27, 141–153 (2018). <https://doi.org/10.3103/S1061386218030020>.
- 71 Somrani, S., Banu, M., Jemal, M., Rey, C. Physico-chemical and thermochemical studies of the hydrolytic conversion of amorphous tricalcium phosphate into apatite, *Journal of Solid State Chemistry* 2005, 178, 5, 1337-1348. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2004.11.029>.
- 72 Cañaveral, S., Morales, D., Vargas, A. F. Synthesis and characterization of a 58Sbioglass modified with manganese by a sol-gel route, *Materials Letters*, 255, 126575, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2019.126575>.
- 73 A.A. Al-esnawy, Khairy T. Ereiba, Ahmed M. Bakr, A.S. Abdraboh. Characterization and antibacterial activity of Streptomycin Sulfate loaded Bioglass/Chitosan beads for bone tissue engineering, *Journal of Molecular Structure* 2021, 1227: 0022-2860. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129715>.
- 74 Gómez-Cerezo, M. N., Peña, J., Ivanovski, S. Arcos, D., et al. Multiscale porosity in mesoporous bioglass 3D-printed scaffolds for bone regeneration, *Materials Science and Engineering: C* 2021, 120:0928-4931. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111706>.
- 75 Amit Kumar, Kartikeya Dixit, Niraj Sinha. Fabrication and characterization of additively manufactured CNT-bioglass composite scaffolds coated with cellulose nanowhiskers for bone tissue engineering, *Ceramics International* 2023, 49 (11), Part A, 17639- 17649, 0272-8842. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.02.130>.

APÊNDICE A - HISTÓRICO ACADÊMICO

Premiação em apresentação oral durante a Iniciação Científica (2019)

Graduação Licenciatura em Química, UFF (2020)

Programa de Estágio à Docência (2021)

Curso de Comunicação e Escrita Científica. Realizado durante o Mestrado
(2021)

Apresentação de Pôster em Congresso (2022)

Apresentação de Pôster em Congresso (2023)