

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS
CURSO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

FRANCIELE TEIXEIRA FÉLIX

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO E
NANOFIBRAS DE CELULOSE PARA POTENCIAL APLICAÇÃO NO REPARO DE
TECIDOS ÓSSEOS**

BELO HORIZONTE

2016

FRANCIELE TEIXEIRA FÉLIX

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO E
NANOFIBRAS DE CELULOSE PARA POTENCIAL APLICAÇÃO NO REPARO DE
TECIDOS ÓSSEOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado no Curso de Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais

Orientadora: Dra. Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo

Coorientador: Dr. Sidney Nicodemos da Silva

BELO HORIZONTE

2016

Dedico esse trabalho a meus amados pais, José Luiz e Maria Aparecida; a minha inseparável irmã, Alessandra; e a minha auxiliadora no projeto, Danielle e colega de trabalho Jéssica. Pessoas indispensáveis que Deus colocou no meu caminho, cujo apoio constrói todo o sucesso desse trabalho.

FRANCIELE TEIXEIRA FÉLIX

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS DE FOSFATO DE CÁLCIO E
NANOFIBRAS DE CELULOSE PARA POTENCIAL APLICAÇÃO NO REPARO DE
TECIDOS ÓSSEOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado no Curso de Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais

Aprovado em 09 de dezembro de 2016

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo

Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva

Prof. Dr. Paulo Renato Perdigão de Paiva

“Meu filho, se você aceitar as minhas palavras e guardar no coração os meus mandamentos; se der ouvidos à sabedoria e inclinar o coração para o discernimento; se clamar por entendimento e por discernimento gritar bem alto, se procurar a sabedoria como se procura a prata e buscá-la como quem busca um tesouro escondido, então você entenderá o que é temer ao Senhor e achará o conhecimento de Deus. Pois o Senhor é quem dá sabedoria; de sua boca procedem o conhecimento e o discernimento. Ele reserva a sensatez para o justo; como um escudo protege quem anda com integridade, pois guarda a vereda do justo e protege o caminho de seus fiéis. Então você entenderá o que é justo, direito e certo, e aprenderá os caminhos do bem. Pois a sabedoria entrará em seu coração, e o conhecimento será agradável à sua alma. O bom senso o guardará, e o discernimento o protegerá.”

Provérbios 2:1-11

RESUMO

O reparo fisiológico do tecido ósseo nem sempre é possível dependendo da extensão e da gravidade da lesão. Uma solução possível é a utilização de *scaffolds* e materiais de enxerto que auxiliem na diferenciação, crescimento e colonização de células ósseas para a regeneração do tecido. Neste trabalho foram produzidos e caracterizados compósitos formados por nanofibras de celulose (NFC) e fosfato de cálcio bifásico (BCP) para potencial aplicação em engenharia de tecido ósseo. NFC foram produzidas a partir de hidrólise ácida de algodão comercial, seguida de neutralização com hidróxido de sódio e secagem em estufa. NFC foram caracterizadas através de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Difração de Raios X (DRX). Compósitos de BCP reforçados com diferentes concentrações de NFC (25% e 40%) foram obtidos através da técnica de produção de espumas e caracterizados por FTIR, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Ângulo de Contato e método Brunauer, Emmett e Teller (Método BET) para obtenção da área superficial e porosidade dos materiais. A produção de NFC apresentou um rendimento elevado. As nanofibras de celulose possuíam parâmetros físico-químicos como diâmetro médio, índice de cristalinidade e formação de aglomerados semelhantes aos previamente descritos na literatura. Os compósitos produzidos apresentaram bandas de absorção no espectro de infravermelho compatíveis com NFC e BCP. Não foi verificada a presença de contaminantes nas amostras. Análises qualitativas da Microscopia Eletrônica de Varredura indicam que os compósitos produzidos apresentam poros na ordem de 10 μ m. A adição de nanofibras de celulose à matriz cerâmica aumentou a hidrofiliabilidade do material. Adição de 25% de NFC ao BCP ocasiona um aumento da área superficial, entretanto concentrações maiores de NFC induzem redução na área superficial do compósito. Provavelmente essa redução se deve ao alto grau de aglomeração das NFC que se refletiu também no tamanho das partículas. Os compósitos produzidos apresentam características compatíveis com a aplicação no reparo de tecidos ósseos.

Palavras chave: tecido ósseo, compósito, nanofibra de celulose, fosfato de cálcio bifásico.

ABSTRACT

The physiological repair of the bone tissue is not always possible depending on the extent and severity of the lesion. One possible solution is the use of scaffolds and graft materials that aid in the differentiation, growth and colonization of bone cells for tissue regeneration. In this work, composites formed by cellulose nanofibres (CNF) and biphasic calcium phosphate (BCP) were produced and characterized for potential application in bone tissue engineering. CNF were produced from acid hydrolysis of commercial cotton, followed by neutralization with sodium hydroxide and drying in an oven. CNF were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Transmission Electron Microscopy (TEM) and X-ray Diffraction (XRD). BCP composites reinforced with different concentrations of NFC (25% and 40%) were obtained through the foaming technique and characterized by FTIR, Scanning Electron Microscopy (SEM), and Brunauer, Emmett and Teller Method (BET Method) to obtain the surface area and porosity of the materials. Production of NFC showed physico-chemical parameters as yield, mean diameter, crystallinity index and agglomerates formation similar to those previously described in the literature. The composites produced showed absorption bands in the infrared spectrum compatible with NFC and BCP. The presence of contaminants in the samples was not verified. Qualitative analyzes of Scanning Electron Microscopy indicate that the composites produced have pores in the order of 10 μm . The addition of cellulose nanofibers to the ceramic matrix increased the hydrophilicity of the material. Addition of 25% NFC to BCP causes an increase in surface area, however higher concentrations of NFC induce reduction in the composite surface area. Probably this reduction is due to the high degree of agglomeration of the NFC that also reflected in the size of the particles. The composites produced have characteristics compatible with the application in the repair of bone tissues.

Key words: bone tissue, composite, cellulose nanofiber, biphasic calcium phosphate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do sistema de Havers em um osso longo.....	16
Figura 2 - Estrutura do osso esponjoso e compacto	17
Figura 3 - Condrócitos, lacunas e fibras colágenas.	19
Figura 4 - Fases da reparação óssea	21
Figura 5 - Unidade de repetição da celulose	30
Figura 6 - Obtenção da celulose microfibrilada e nanocristalina a partir da fibra purificada.	33
Figura 7 - Representação da inserção do grupo sulfato proveniente da hidrólise com H ₂ SO ₄ na cadeia de celulose.....	33
Figura 8 - Diagrama de solubilidade para o sistema ternário Ca(OH) ₂ -H ₃ PO ₄ -H ₂ O a 37°C	36
Figura 9 - Diagrama do interferômetro de Michelson	42
Figura 10 - Interferograma e interferograma com transformada de Fourier	42
Figura 11 - Estrutura geral do canhão de elétrons.....	44
Figura 12 - Arranjo ótico para contraste relacionado à massa e densidade da amostra.	45
Figura 13 - Representação da Lei de Bragg	45
Figura 14 - Ângulos de contato de líquidos com superfícies sólidas	47
Figura 15 - Fluxograma das etapas de trabalho	50
Figura 16 - Distribuição Granulométrica das partículas de BCP.....	51
Figura 17 - DRX das partículas de BCP.....	51
Figura 18 - Produção das Nanofibras de Celulose	52
Figura 19 - Produção dos compósitos BCP-NCF.....	53
Figura 20 – Aspecto macroscópico das NCF	57
Figura 21 – FTIR das amostras de algodão e NFC	59
Figura 22 - MET das NFC	60
Figura 23 - DRX das amostras de algodão e NFC	61
Figura 24 - Partículas e pastilhas de BCP100, BCP75 e BCP60	63
Figura 25 - FTIR comparativo entre as amostras BCP100, NFC e os compósitos BCP75 e BCP60	65
Figura 26 - MEV da amostra BCP100 e dos compósitos BCP75 e BCP60.....	66

Figura 27 - Ângulo de contato da pastilha BCP10067

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição de celulose, hemicelulose e lignina em diversas fibras.....	29
Tabela 2 - Valores de resistência à tração e módulo de Young de algumas cargas utilizadas como reforço de matrizes poliméricas.....	34
Tabela 3 - Razão Ca/P e ocorrências de fosfatos de cálcio em sistemas biológicos	35
Tabela 4 - Índice de bioatividade (Ib) de diferentes biomaterias.....	37
Tabela 5 - Intensidade dos picos obtidos no DRX e Índice de Cristalinidade.	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivos Gerais	13
2.2. Objetivos Específicos.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1. O Tecido Ósseo	14
3.1.1. <i>Tipos de tecido ósseo</i>	15
3.1.2. <i>Histogênese</i>	17
3.2. Reparo Fisiológico De Fraturas Ósseas – Regeneração Do Tecido	19
3.3. Biomateriais e o Reparo De Fraturas Ósseas	22
3.4. Celulose	28
3.4.1. <i>Biossíntese de materiais celulósicos</i>	30
3.5. Fosfatos De Cálcio	34
3.5.1. <i>Síntese</i>	35
3.5.2. <i>Principais fosfatos de cálcio (CaP)</i>	36
3.6. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	41
3.6.1. Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier – FTIR	41
3.6.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET	43
3.6.3. Difração de RaiosX - DRX.....	45
3.6.4. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV	46
3.6.5. Ângulo de Contato.....	47
3.6.6. Área Superficial e Porosidade Pelo Método de Brunauer, Emmett e Taller (BET)	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1. Materiais	50
4.2. Preparo das Nanofibras de Celulose (NFC).....	52
4.3. Preparo dos compósitos BCP-NCF.....	52
4.4. Caracterização das Nanofibras de Celulose (NFC).....	54
4.4.1. <i>Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier - FTIR</i>	54
4.4.2. <i>Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET</i>	54
4.4.3. <i>Difração de RaiosX - DRX</i>	54
4.5. Caracterização dos compósitos de BCP e NFC	55
4.5.1. <i>Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier - FTIR</i>	55

4.5.2.	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV</i>	55
4.5.3.	<i>Ângulo de Contato</i>	56
4.5.4.	<i>Isotermas de Brunauer, Emmett e Teller (BET)</i>	56
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1.	Produção e Caracterização das Nanofibras de Celulose	57
5.2.	Produção e Caracterização dos Compósitos de BCP e NFC	62
6.	CONCLUSÃO	69
7.	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	70
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo tem as funções de sustentação, proteção, movimentação, manutenção de minerais e lipídeos do organismo, além de hematopoiese. Portanto, a saúde dos ossos influencia grandemente a qualidade de vida. Diversos fatores têm aumentado a demanda de reparação osteocondral. Dentre eles destacam-se os danos relacionados ao crescente número de lesões esportivas, traumas de acidentes, patologias congênitas e não congênitas. (TORTORA; DERRICKSO, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011; SEO *et al.*, 2014).

Dados da BHTRANS indicam que o número de vítimas não fatais em acidentes de trânsito na cidade de Belo Horizonte tem aumentado consideravelmente. O último levantamento disponível indica um aumento de 18% no ano de 2013. Essas vítimas frequentemente são mutiladas e necessitam de reposição ou reestabelecimento tecidual (BELO HORIZONTE, 2014).

Dados do hospital Oswaldo Cruz mostram que o aumento da demanda de regeneração óssea também pode ser atribuído à osteoporose, doença caracterizada pela redução da massa óssea e consequente fragilidade do esqueleto e maior suscetibilidade a fraturas. A osteoporose é uma enfermidade multifatorial que depende aproximadamente 30% de fatores ambientais e 70% de fatores genéticos. A idade avançada é um importante fator de risco pois, além de levar a baixa densidade mineral óssea, eleva o risco de quedas devido à diminuição da qualidade óssea e função neuro-muscular. Presume-se que cerca de 40% das mulheres e 25% dos homens que estiverem vivos até os 80 anos terão, por causa da doença, fratura de fêmur (PINHEIRO, 2015). Esse fator é preocupante visto que dados do IBGE estimam que em 2041 a expectativa de vida ao nascer alcance os 80 anos.

O tecido ósseo pode se recuperar naturalmente em condições fisiológicas para danos de pequena extensão, isto é, fraturas milimétricas. Entretanto, para extensões maiores o reparo natural não recupera a forma ou funcionalidade natural do osso e enxertos autógenos são em geral a primeira opção médica. Entretanto, este tratamento possui limitações: disponibilidade de enxerto, defeito gerado na extração do enxerto e pós-operatório de duas áreas lesionadas. Nesse sentido, a utilização de biomateriais como enxertos ósseos e matrizes porosas para a engenharia de tecidos são estratégias de pesquisa extensivamente estudadas para o reparo de tecido ósseo. (PETERSON, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Produzir e caracterizar físico-quimicamente um material compósito constituído por diferentes proporções de fosfato de cálcio bifásico (BCP) e nanofibra de celulose (NFC) para possível aplicação no reparo de lesões do tecido ósseo.

2.2. Objetivos Específicos

- Produzir NCF a partir de algodão comercial pelo procedimento de hidrólise ácida;
- Caracterizar as NFC produzidas através das seguintes técnicas: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Difração de RaiosX (DRX);
- Produzir compósitos de BCP reforçados com NFC, para melhora das propriedades mecânicas, em duas diferentes proporções através da técnica de produção de espumas;
- Caracterizar os compósitos produzidos através das seguintes técnicas: FTIR, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Ângulo de Contato e método Brunauer, Emmett e Taller (BET) para obtenção da área superficial e porosidade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O Tecido Ósseo

O tecido ósseo é o principal constituinte do sistema esquelético. As principais funções do sistema ósseo são: sustentação dos tecidos moles e musculatura através da fixação de tendões do músculo esquelético; auxílio ao movimento trabalhando coordenadamente com o sistema muscular; proteção de órgãos vitais; armazenamento de triglicérides na medula óssea amarela; hematopoiese na medula óssea vermelha e homeostase mineral. Por homeostase mineral entende-se a disponibilização de minerais como cálcio e fósforo, armazenados nos ossos, quando solicitados pelo organismo; e também a absorção de algumas toxinas e metais pesados (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011; TORTORA; DERRICKSO, 2012).

O tecido ósseo é composto pelas células osteoblastos, osteócitos e osteoclastos; e pela matriz óssea calcificada, inicialmente não mineralizada e secretada pelas duas primeiras células citadas (ALBERTS *et al.*, 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011; OVALLE; NAHIRNEY, 2014).

Os osteoblastos são células jovens e muito ativas do sistema ósseo que se originam pela diferenciação dos fibroblastos, células indiferenciadas que estão na membrana do tecido conjuntivo que reveste os ossos. Essas células imaturas secretam a parte orgânica do osso, a matriz extracelular óssea não mineralizada, também chamada de osteóide. O osteoblasto sintetiza também a fosfatase alcalina, uma proteína de superfície que promove a mineralização da matriz óssea através da deposição de cristais de hidroxiapatita (HA) (ALBERTS *et al.*, 2009).

O osteócito é a principal célula constituinte do tecido; a célula madura, portanto, menos ativa. Os osteócitos são derivados dos osteoblastos que foram aprisionados individualmente na matriz óssea após sua mineralização. O osteócito não se divide, mas tem a capacidade de permanecer secretando matriz, em pequenas quantidades, em torno de si mesmo. Além disso, contribui para a sustentação do tecido ósseo. Nas colunas em que se encontram, estão presentes canalículos pelos quais os prolongamentos dos osteócitos se comunicam por junções comunicantes (ALBERTS *et al.*, 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011; OVALLE; NAHIRNEY, 2014).

Os osteoclastos são as células móveis, gigantes, multinucleadas e com ramificações irregulares responsáveis pela reabsorção óssea. Os osteoclastos originam-se, assim como os macrófagos, das células-tronco hematopoiéticas na medula óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

Alberts *et al.* (2009) descreve que a porção orgânica do osteóide é formada basicamente por 95% de fibras rígidas de colágeno do tipo I e 5% de proteoglicanos e glicoproteínas não colagênicas como osteocalcina e osteopontina. A parte inorgânica da matriz óssea é constituída de íons fosfato e cálcio na forma de cristais de hidroxiapatita (HA) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011). Esses cristais possuem uma camada hidratada ao redor (capa de hidratação) que facilita a troca de íons com o líquido intersticial. A associação da HA com fibras colágenas confere resistência e dureza ao tecido ósseo. Além dos íons fosfato e cálcio a parte inorgânica também contém bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato em pequenas quantidades (ALBERTS *et al.*, 2009)

O tecido ósseo está em contínua renovação. Enquanto os osteoblastos, e em menor extensão, os osteócitos secretam continuamente matriz óssea, os osteoclastos promovem a reabsorção do tecido ósseo mais antigo. Estas últimas células possuem uma superfície com vilosidades, ativa, voltada para a matriz óssea, circundada por uma zona citoplasmática clara. Essa zona clara funciona como um local de adesão da célula com a matriz óssea e cria um microambiente fechado onde ocorre a reabsorção óssea. Nesse microambiente são secretados ácido (H^+), colagenase e outras hidrolases que digerem a matriz orgânica e dissolvem os cristais de sais cálcio. Após formar um túnel onde o tecido ósseo foi digerido, vasos sanguíneos crescem em direção ao seu centro e suas paredes revestem-se de osteoblastos que depositam camadas novas de osso preenchendo a cavidade (ALBERTS *et al.*, 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

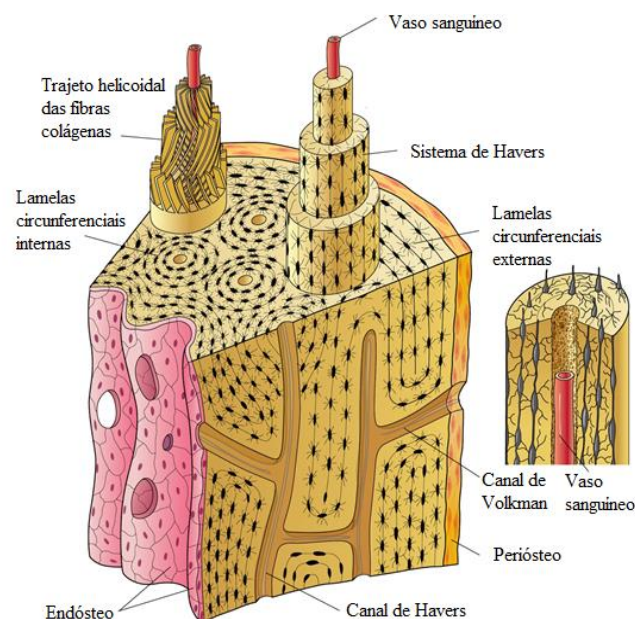
3.1.1. Tipos de tecido ósseo

Os ossos podem ser classificados quanto à sua morfologia em longo, curto e laminar ou quanto à sua anatomia em compacto e esponjoso. Entretanto, a classificação mais relevante que é baseada nas características histológicas, agrupa os tecidos ósseos em primário (imaturo) e secundário (lamelar ou maduro) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

O tecido ósseo primário ou não lamelar apresenta fibras colágenas não orientadas, matriz óssea heterogênea e osteócitos com baixo padrão de organização. Este tecido é encontrado durante os processos de desenvolvimento e crescimento ósseo, sendo gradativamente substituído pelo tecido maduro. Na fase adulta persiste em alguns locais do corpo como ossos do crânio e alvéolos dentários. É o primeiro tecido formado na reparação de fraturas ósseas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

A estrutura do tecido ósseo maduro é formada por osteócitos organizados que ocupam camadas estratificadas (lamelas ósseas) como pode ser observado na Figura 1. A figura também mostra a superfície interna e externa do osso, endóstio e perióstio respectivamente que, além de nutrir, têm a função de fornecer osteoblastos para crescimento e regeneração do osso. O perióstio é composto por fibras colágenas, fibroblastos e células osteoprogenitoras que se dividem por mitose e se diferenciam em osteoblastos. O endóstio é constituído por células osteogênicas achatadas revestindo as cavidades do osso esponjoso, o canal medular, os canais de Havers e de Volkman. Os canais de Havers percorrem o osso longitudinalmente e por eles passam vasos e nervos. Ao redor dos canais de Havers encontram-se lamelas ósseas dispostas concentricamente e são denominadas Ósteons ou sistema de Havers. Pelos canais de Volkman também passam vasos e nervos, mas estes são transversais e oblíquos aos de Havers, atravessam as lamelas ósseas e comunicam entre si (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

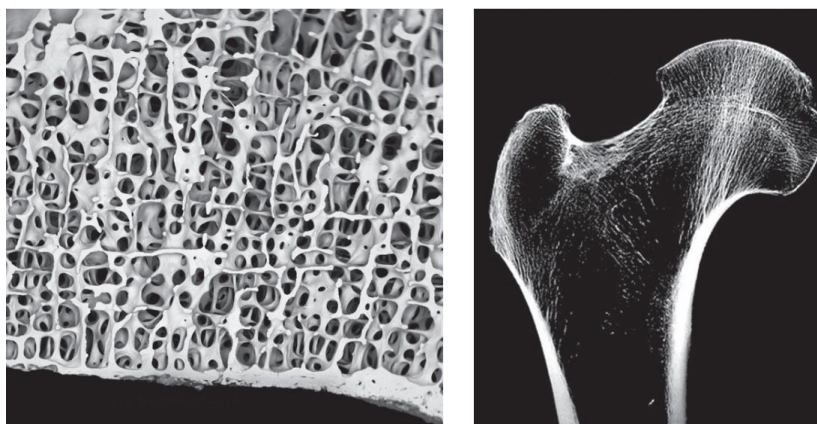
Figura 1 - Representação esquemática do sistema de Havers em um osso longo.



Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011.

Junqueira e Carneiro (2011) descrevem a estrutura anatômica dos ossos, neles observa-se uma porção compacta (ou cortical) e outra esponjosa (ou trabecular) que apresentam a mesma constituição histológica, ou seja, ambos são formados por tecido ósseo secundário. Nos ossos longos a epífise é formada por osso cortical com fina camada superficial trabecular e a diáfise é formada por osso compacto em quase sua totalidade com pequenas quantidades de osso esponjoso na delimitação do canal medular, as estruturas compacta e esponjosa podem ser observadas na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura do osso esponjoso e compacto



Fonte: ALBETS *et al.*, 2009.

A medula óssea vermelha encontra-se nas cavidades dos ossos esponjosos e na diáfise dos ossos longos. Ao longo dos anos, com a diminuição da hematopoiese, a medula é infiltrada por tecido adiposo e dá origem à medula amarela. A atividade hematopoiética permanece principalmente nos ossos longos como o fêmur (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

3.1.2. Histogênese

Há dois tipos de ossificação, a intramembranosa e a endocondral. Na primeira, o tecido ósseo é formado no interior de uma membrana conjuntiva e na segunda, através de um molde de cartilagem hialina. Nessa última, a morfologia do tecido ósseo está intimamente relacionada com a morfologia do molde cartilaginoso que o pressupõe (ALBERTS *et al.*, 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

Na ossificação intramembranosa o tecido ósseo é formado pela diferenciação de células mesenquimatosas no interior das membranas conjuntivas em osteoblastos que secretam o osteóide e que posteriormente é calcificado. Pequenos grupos ósseos são formados e posteriormente ocorre confluência entre eles dando origem a um tecido esponjoso. Nos poros formados há angiogênese, os vasos formados levam consigo células indiferenciadas que originarão a medula óssea. Essa ossificação forma os ossos frontal, parietal e partes do occipital, temporal e maxilares e é responsável pelo crescimento de ossos curtos e aumento em espessura de ossos longos. A membrana conjuntiva que não ossifica forma o endóstio e o perióstio e nos ossos chatos do crânio as camadas de ossos compactos são formadas em decorrência de uma maior taxa de ossificação em relação à taxa de osteoabsorção. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011)

Na ossificação endocondral o osso se desenvolve a partir de um molde de cartilagem hialina, que é o tipo mais comum e característico de tecido cartilaginoso. Esse molde, formado no feto, possui mesma forma do osso maduro, porém, em menor escala (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011; OVALLE; NAHIRNEY, 2014)

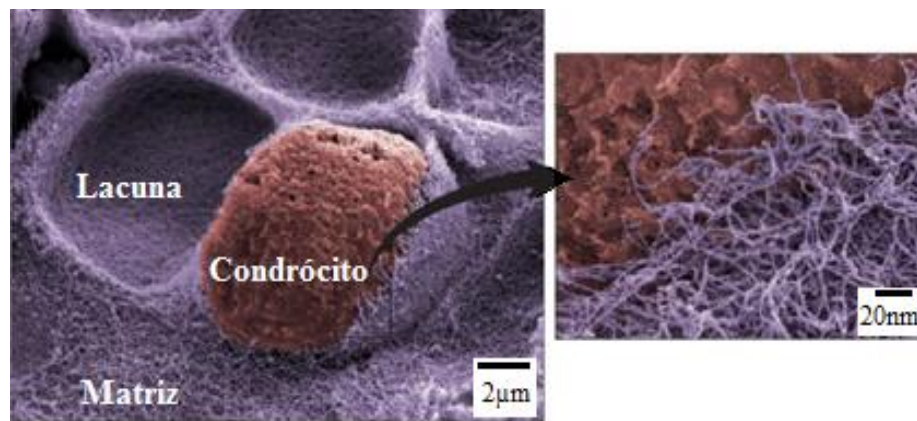
A cartilagem hialina, como todo tecido cartilaginoso, cresce por expansão e se forma a partir do condroblasto, sua célula jovem. O condroblasto secreta matriz hidratada composta por proteoglicanos e colágeno do tipo II e acaba aprisionado nela própria, em lacunas denominadas condroplastos. Na Figura 3 pode-se observar uma eletromicrografia de varredura (MEV) colorizada de um grupo isógeno de cartilagem hialina. Um condrócito encontra-se envolto em sua delicada matriz fibrilar e a preparação do espécime removeu condrocitos deixando lacunas adjacentes vazias. Nos condroplastos essas células amadurecem e ficam pouco ativas, passando a ser denominadas condrocitos (ALBERTS *et al.*, 2009).

No estágio embrionário as células indiferenciadas que originarão os ossos encontram-se condensadas. Essas células, após expressão de genes específicos, começam a produzir proteínas que atuam como um estímulo à sua diferenciação em tecido cartilaginoso. Uma haste cartilaginosa é então formada. Posteriormente, um colar ósseo é formado ao redor dessa haste quando genes específicos de diferenciação em tecido ósseo passam a ser expressos (ALBERTS *et al.*, 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

As células da haste logo morrem por apoptose deixando cavidades na matriz que logo é mineralizada pela deposição de fosfatos de cálcio. Essas cavidades são invadidas por osteoclastos, vasos sanguíneos e osteoblastos; vindos do tecido conjuntivo adjacente que,

respectivamente, corroem a matriz cartilaginosa residual criando espaço para medula óssea; trazem células tronco que dão origem à medula óssea e depositam osso trabecular onde ainda restam fragmentos de matriz cartilaginosa como molde. Forma-se assim o centro de ossificação primário. O alongamento do osso depende da placa de crescimento localizada entre a diáfise e a epífise (disco epifásico) e o canal medular cresce juntamente com o alongamento da estrutura óssea (ALBERTS *et al.*, 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO; 2011).

Figura 3 - Condrócitos, lacunas e fibras colágenas.



Eletromicrografia de varredura do condrócito em sua lacuna, aumento de 5000x. Uma visão das fibrilas colágenas é observada à direita, com aumento de 25000x.

Fonte: OVALLE; NAHIRNEY, 2014.

O centro de ossificação secundário é formado em sequência, situa-se na epífise e cresce de forma radial. Seu centro também contém medula óssea. Por conseguinte, a placa de crescimento é substituída por tecido ósseo e desaparece. O único resquício de cartilagem que sobra é uma fina camada sobre as superfícies ósseas e junções (cartilagem articular) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

3.2. Reparo Fisiológico De Fraturas Ósseas – Regeneração Do Tecido

O reparo de ossos longos, ao contrário de ossos chatos do crânio e da face, envolve tanto ossificação intramembranosa quanto endocondral. Para recuperação do tecido sucedem nesse processo eventos inflamatórios, reparatórios e, em seguida, ocorre a remodelação óssea. A fase inflamatória, assim como nos demais tecidos do corpo quando lesados, gera edema, coágulo oriundo dos vasos rompidos, hematoma e morte celular devido à interrupção da oxigenação que anteriormente chegava ao tecido (OVALLE; NAHIRNEY, 2014).

De acordo com Peterson (2004) existem dois tipos de cicatrização do tecido ósseo denominadas de primeira e segunda intenção. As de primeira intenção são aquelas em que as extremidades livres de uma fratura óssea permanecem conectadas ou muito próximas. Nessas, pouco tecido fibroso é produzido e a ossificação ocorre rapidamente sem deposição intensa de colágeno. As de segunda intenção são aquelas em que as extremidades livres da fratura encontram-se separadas em mais de um milímetro. Nessas, haverá deposição tão intensa de colágeno que haverá a formação de uma estrutura circunferencial, denominada calo, que se estende além das extremidades livres do osso. Em condições fisiológicas, o tecido fibroso, incluindo o calo, sofre um processo de ossificação. Entretanto, o calo ossificado é provisório; na última etapa de reparação (remodelação óssea) ele é reabsorvido por osteoclastos totalmente ou parcialmente.

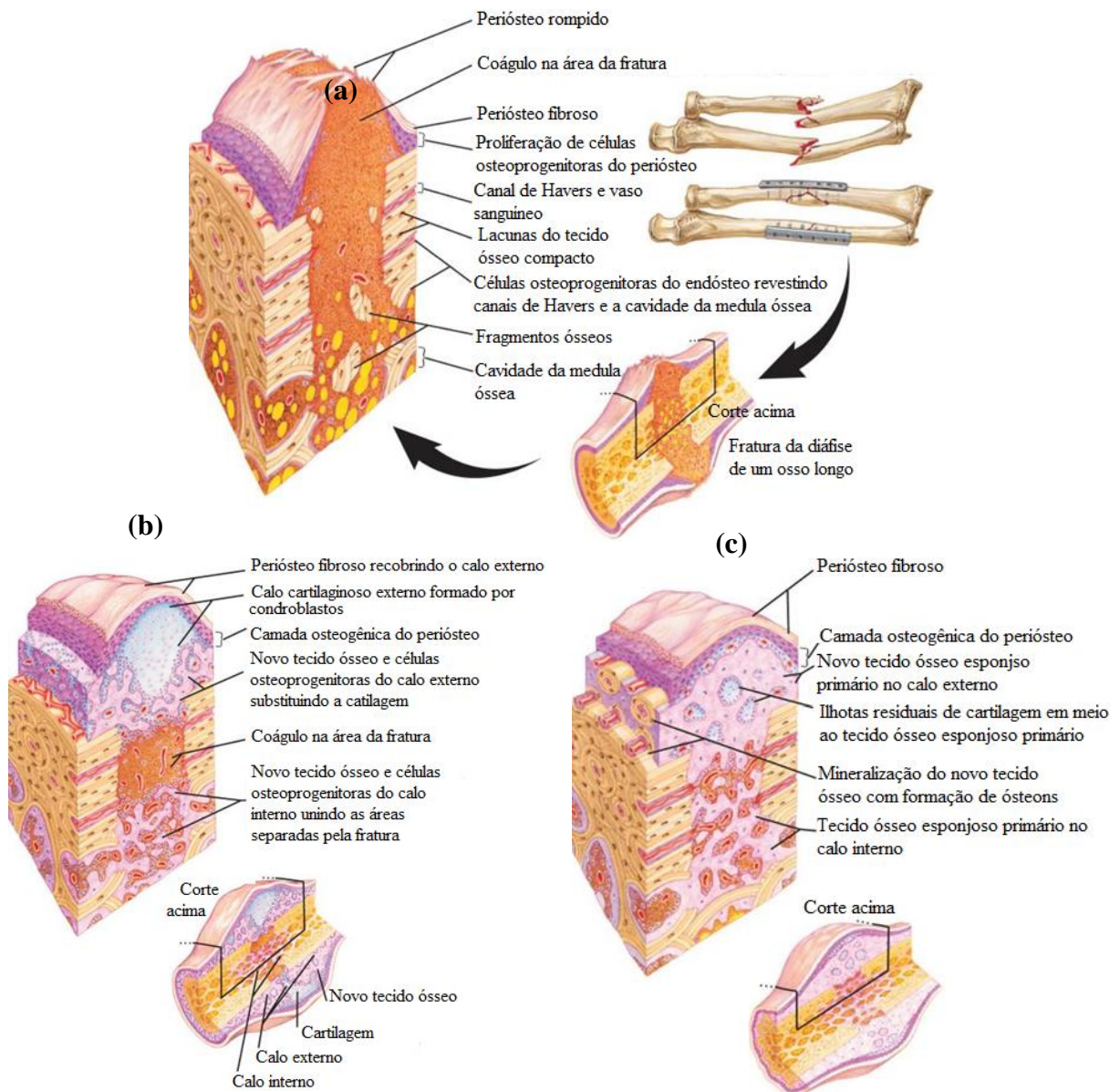
A Figura 4 ilustra as etapas que ocorrem durante o reparo de feridas de segunda intenção (OVALLE; NAHIRNEY, 2014). Cada etapa ilustrada é descrita e acrescida de detalhes abaixo.

Em (a) há na parte superior direita uma fratura do rádio e ulna onde ocorre coagulação e possível encurtamento do osso sem a fixação adequada durante o reparo. Logo abaixo as estruturas rompidas foram fixadas garantindo bom alinhamento e restauração do arco radial durante reparação. Essa imobilidade é importante porque é necessário aplicar tensão em níveis adequados para que a vascularização não seja comprometida, porém suficientes para orientação do tecido neoformado perpendicularmente as linhas de tensão e estimulação contínua da formação osteoblástica no osso. No lado esquerdo a fase inicial de reparação é ilustrada integralmente, há proliferação de células osteoprogenitoras do periósteo recobrimdo a superfície externa do osso e do endósteo revestindo os canais de Havers e cavidade medular. Essas células diferenciam-se em condroblastos formando o calo cartilaginoso ou osteoblastos produzindo tecido ósseo. A limpeza do local é feita pelos osteoclastos e o periósteo se estende para além do local da fratura.

Em (b) o calo cartilaginoso está evidenciado. Em situações de hipóxia tecido cartilaginoso é preferencialmente formado e em regiões oxigenadas tecido ósseo será produzido. O surgimento de novos vasos a partir da angiogênese possibilita a substituição da cartilagem por tecido ósseo esponjoso. O calo interno, constituído por células osteoprogenitoras do endósteo, forma tecido ósseo esponjoso primário em decorrência da alta oxigenação local.

Em (c) o tecido ósseo esponjoso primário, recém formado do calo externo, se estende unindo-se ao tecido ósseo do calo interno preenchendo o defeito. A remodelação definitiva em tecido ósseo compacto secundário acontece com o tempo, o tecido primário é reabsorvido e novas camadas concentricas de tecido ósseo são depositadas formando os novos sistemas de Havers, novos osteons destinados ao córtex são construídos e a cavidade medular é reestabelecida.

Figura 4 - Fases da reparação óssea



Fases de reparação óssea: a) fase inicial, b) fase intermediária e c) fase tardia

Fonte: OVALLE; NAHIRNEY, 2014. (Adaptada).

O reparo anatômico e funcional dos ossos pelo organismo limita-se a situações em que as extremidades dos ossos estão próximas. Entretanto, existem danos que levam a perda de uma grande extensão de material e as extremidades não se unem, ou ocorre uma depressão na região de união, nesse caso uma simples imobilização não soluciona o problema. Em outros casos, há a intenção de produzir osso onde naturalmente não existe, como nas cirurgias de união dos discos da coluna para imobilização. Além da qualidade de vida existem motivações estéticas para algumas cirurgias onde o defeito ósseo se torna aparente. Partindo do pressuposto que nem todo dano é recuperado mantendo-se as propriedades e/ou fisionomia dos ossos, estudos de enxertos ósseos e engenharia de tecidos visando à reconstrução tecidual em sua estrutura e funcionalidade são, portanto, caminhos exploráveis para regeneração de tecido ósseo através de intervenção cirúrgica (PETERSON; OVALLE; NAHIRNEY, 2014).

3.3. Biomateriais e o Reparo De Fraturas Ósseas

Uma das formas de reparação óssea é a adição de enxertos. Um dos tipos de enxerto é denominado autoenxerto, ou enxerto autógeno, este é originado do próprio paciente. A vantagem de realizar esse tipo de transplante é o baixo risco de contaminação, bem como a presença de osteoindução, osteocondução e osteogeneidade. No entanto, a submissão do paciente a mais de uma cirurgia, do sítio doador e do sítio receptor, leva a um processo pós-operatório demorado e faz com que a morbidade da área doadora seja superior à da área receptora. Além do mais, esteticamente, o paciente fica sujeito a mais de uma cicatriz no corpo. Alguns materiais autógenos são osso esponjoso colhido geralmente do osso íliaco ou tibia proximal, e aspirado de medula óssea colhido através de punção da crista íliaca e centrifugado de forma a concentrar células estaminais (GUTIERRES *et al.*, 2005; STEIN, 2009).

O aloenxerto, por sua vez, é proveniente de um doador da mesma espécie e possui tratamentos prévios contra resposta inflamatória intensa e infecção. São congelados ou liofilizados. Seu processamento também possibilita a sua utilização em diversas formas como gel, pó, fibras e pastas. O homoenxerto é um tipo de aloenxerto e consiste na matriz óssea desmineralizada produzida através da imersão do aloenxerto em meio ácido, colágeno, fatores de crescimento e proteínas não colagêneas são mantidas. Sua desvantagem é a redução da resistência estrutural da matriz resultante (GUTIERRES *et al.*, 2005; MACHADO, 2007).

Os xenoenxertos são provenientes de outras espécies e necessita de tratamentos contra antígenos, deslipidização e desproteínização, e também a adição de células da medula óssea humana (GUTIERRES *et al.*, 2005).

Os enxertos aloplásticos, por sua vez, são substitutos ósseos sintéticos amplamente estudados na área de biomateriais. Tem como vantagem a produção em escala industrial e a elevada disponibilidade. Entretanto, necessitam de tratamentos para elevação do grau de osteogenicidade e osteocondução. Nesse campo de enxertos aloplásticos para reconstrução óssea se encontram os materiais cerâmicos como sulfato de cálcio, vidros bioativos e fosfatos de cálcio (BCP, TCP, HA) (GUTIERRES *et al.*, 2005; STEIN, 2009).

As novas células ósseas que colonizam os enxertos podem ser derivadas do próprio tecido enxertado, quando este é autógeno; da invasão de osteoblastos provenientes do tecido ósseo adjacente ao implante; ou da transformação de células mesenquimais do paciente em osteoblastos. Para neoformação tecidual, faz-se necessário que o enxerto possua três características: uma fonte de células capazes de se diferenciar em tecido ósseo; estímulo osteoindutor para que a diferenciação das células mesenquimais – em enxertos sintéticos é comum adicionar fatores de crescimento e moléculas sinalizadoras para esse fim; e um meio osteocondutor para crescimento do tecido (STEIN, 2009).

Características adicionais são importantes para um material a ser utilizado com enxerto ósseo, são elas: serem semelhantes com o tecido ósseo em sua estrutura química, física e mecânica; serem biocompatíveis, bioreabsorvíveis, fácil de usar e com custo acessível (STEIN, 2009).

Um cimento de fosfato de cálcio pode ser preparado a partir de um sal fosfato de cálcio que ao ser misturado com a água reage em temperatura ambiente ou corporal e forma precipitados que contêm fosfatos de cálcio como a hidroxiapatita (HA). Como citado anteriormente, esses materiais possuem excelentes habilidades em reparo ósseo (MACHADO, 2007).

Implantes porosos possuem elevada área superficial permitindo maior contato entre o sistema biológico e o enxerto. Dessa forma algumas importantes características são adquiridas, como: maior resistência na interface do material, imobilidade do implante, possibilidade de resposta inflamatória minimizada. Para obtenção de enxertos cerâmicos porosos é comum a adição de uma fase orgânica ao material cerâmico que, após ser eliminada na sinterização, deixa poros no cerâmico (MACHADO, 2007).

Outra estratégia interessante para o reparo de tecidos ósseos é induzir a formação de um novo tecido através da proliferação e diferenciação de células provenientes do próprio paciente *in vitro* para, posteriormente, recolocá-las no tecido lesionado. Porém, as células que crescem em meio de cultura tendem a multiplicar e proliferar somente em duas dimensões, de forma desorganizada. É muito difícil conseguir que células submetidas a essas condições cresçam ordenadamente formando uma estrutura tridimensional, característica dos tecidos vivos (WILLIAMS *et al.*, 2005; BARBARISI *et al.*, 2014).

Para superar essas limitações são desenvolvidas matrizes tridimensionais para crescimento celular, conhecidas pelo termo em inglês *scaffold*. Os *scaffolds* são, portanto, a estratégia da engenharia de tecidos para tridimensionalmente reparar, reconstruir ou melhorar o desempenho de estruturas teciduais de pacientes, perdidas ou danificadas. Os *scaffolds* são arcabouços, estruturas tridimensionais temporárias que otimizam o crescimento e a distribuição espacial das células, providenciando suporte mecânico adequado para a regeneração tecidual, através das células proliferativas, de forma organizada em estruturas complexas. Essas estruturas tridimensionais têm microestrutura e topografia controladas, simulam as atividades celulares do tecido em reparo, imitam a matriz extracelular e ainda podem ser enriquecidos com biomoléculas que facilitem a integração do biomaterial com o tecido circundante e a regeneração tecidual, como fatores de crescimento e indutores de diferenciação. Todas as características citadas interferem na ligação entre material e tecido, isto é, na sua bioatividade. *Scaffolds* biologicamente ativos são recentes como se percebe na citação abaixo: (WILLIAMS *et al.*, 2005; BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012; BARBARISI *et al.*, 2014).

O primeiro scaffold biologicamente ativo foi sintetizado em 1974; o seu comportamento de degradação e excepcionalmente baixa antigenicidade *in vivo*, bem como o seu comportamento tromboresistente *in vitro*, foram descritas. A patente inicial descrevendo estes scaffolds foi concedida em 1977. Princípios para a síntese de um scaffold biologicamente ativo, incluindo a importância crítica da taxa de degradação, foram descritos em detalhe em 1980 (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011, p. 2).

Segundo Dhandayuthapani *et al* (2011), um *scaffold* ideal deve promover interações do biomaterial que o constituí com as células adjacentes que formarão o tecido, adesão celular, deposição de matriz extracelular (MEC), oxigenação e nutrientes para sobrevivência

celular, proliferação e diferenciação de células, se biodegradar em taxas controláveis que se assemelhem a taxa de regeneração tecidual, provocar um grau mínimo de inflamação ou toxicidade *in vivo*. Em outras palavras, BOSE *et al.* (2012) e SEO *et al.* (2015) sintetizam essas características em biodegradabilidade, bioreabsortividade, compatibilidade mecânica, tamanho de poro adequado e biocompatibilidade. Essas características são detalhadas a seguir.

A biodegradabilidade e biorreabsortividade *in vivo* é um importante fator que determina o sucesso do *scaffold*. Um material biodegradável é aquele que se degrada no organismo e um biorreabsorvível é aquele cujos produtos de biodegradação são eliminados pelas vias metabólicas normais do organismo. É desejável que as taxas de degradação do material e proliferação celular sejam equivalentes, dessa forma, o volume degradado cede espaço para ser gradualmente ocupado pelas células. O período de degradação para aplicações ósseas deve garantir a manutenção do *scaffold* no organismo por meses. O período em que o *scaffold* deve permanecer no organismo em aplicações ósseas deve ser de até 9 meses, dependendo da aplicação deste. (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012).

Quanto às propriedades mecânicas, Williams *et al* (2005) e Seo *et al* (2014) ressaltam que compreender cada camada óssea com densidade e geometria diferente, e consequentemente com propriedades mecânicas variáveis, é importante para um projeto de *scaffold* anatomicamente e funcionalmente eficaz. Bose, Roy e Bandyopadhyay (2012) indicam que o módulo de Young na região cortical está entre 15,0 e 20,0 GPa e na porção trabecular entre 0,1 e 2,0 GPa. A resistência à compressão, por sua vez, varia entre 100 e 200 MPa na porção cortical e entre 2,0 e 20,0 Mpa na região trabecular. Há ainda a necessidade de o implante estar fixado adequadamente, a má fixação e consequente mobilidade tende a lesionar os tecidos e aumentar a resposta inflamatória do organismo.

Quanto à porosidade, Seo *et al* (2015) corrobora que os poros interconectados têm como finalidade permitir a vascularização e influenciar na invasão celular, interferindo assim na organização no tecido formado. A estrutura dos poros deve ser semelhante à do osso para facilitar a integração com o tecido adjacente. O osso nativo poroso possui de 50% a 90% de porosidade com diâmetro de poro de aproximadamente 1mm e por isso *scaffolds* devem apresentar porosidade superior a 50%. Quanto ao diâmetro dos poros; Bose, Roy e Bandyopadhyay (2012) exploram que, para vascularização, poros de 100µm já seriam eficientes, mas não otimizariam o crescimento ósseo. Por isso, os *scaffolds* mais usuais possuem diâmetros de poros que se encontram entre 200 a 350µm para garantir a osteogênese

adequada. Acrescentam ainda que estudos recentes mostram que materiais multi-escala, isto é, com micro e macro porosidades, têm apresentado melhores resultados, mas estes materiais apresentam maior complexidade de produção.

Vários métodos de fabricação podem ser explorados para produção de *scaffolds* com poros interconectados. Materiais de nanofibras produzidos por eletrofição apresentam resultados promissores, mas essa técnica, isoladamente, produz poros de diâmetros inferiores aos necessários para a osteogênese. Métodos convencionais como evaporação de solvente / lixiviação de partículas, espuma de gás, e separação de fases levam à formação de poros de dimensões controladas que podem ser usadas em reparação óssea. Um método com maior precisão e eficiência para produção de *scaffolds* com geometria controlável é a prototipagem rápida, baseada na modelagem computacional e deposição de fibras poliméricas por fusão através de um bocal guiado por computadores 3D, permite alcançar geometrias complexas e controladas. (SEO *et al.*, 2015)

Apesar da porosidade ser fundamental para o desempenho dos *scaffolds*, a presença de poros reduz sua resistência mecânica. Aliadas as propriedades descritas como desejáveis a um *scaffold*, a resistência mecânica associada à porosidade também é uma das características analisadas na escolha de materiais para implantes biomédicos. Encontrar um material ideal, portanto, é um desafio. A densidade das biocerâmicas se aproxima à do osso cortical e dos polímeros à do osso trabecular, no entanto, compósitos destes dois são tipicamente mais fracos que o osso. Metais satisfazem as propriedades mecânicas requeridas, mas não promovem a integração necessária entre material, além disso, a lixiviação de íons é indesejada. (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012).

A biocompatibilidade, por sua vez, envolve vários conceitos apresentados anteriormente. Entende-se por biocompatibilidade a habilidade que o material tem de suportar a atividade celular normal, incluindo sinalização molecular, sem ser tóxico ao tecido; isto é, sem induzir respostas inflamatórias prolongadas. Um *scaffold* ideal para reconstrução óssea deve ser osteocondutor, isto é, promover a neoformação óssea através da adesão, diferenciação, proliferação e crescimento de células, alcançando a reconstituição do tecido. Para tal, usualmente o biomaterial mimetiza a matriz extracelular na sua superfície e na presença de poros. Pode também ser osteoindutor, isto é, atrair células progenitoras mesenquimais para o local da diferenciação. Para tal faz-se necessário a influência de agentes indutores que são acrescentados intencionalmente ao biomaterial. Além disso, o *scaffold* pode

suportar ou até mesmo promover a construção de vasos sanguíneos (angiogênese) em seu interior ou ao redor do implante para um ativo transporte de nutrientes e oxigênio. (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012; SEO *et al.*, 2014).

Seo *et al.* (2014) discorre sobre a importância dos polímeros na seleção de materiais biocompatíveis. Sintéticos ou naturais, esses materiais possuem excelente flexibilidade e adaptação de forma por várias técnicas de moldagem e fundição. Os polímeros naturais, tais como as biomoléculas de glicosaminoglicanos e colágeno são usualmente acrescentados aos *scaffolds* de polímeros sintéticos para melhorar sua afinidade biológica e bioatividade com o tecido adjacente. Essa melhora faz-se necessária porque polímeros sintéticos possuem pobre atividade superficial e baixa afinidade celular. Em contrapartida, a resistência mecânica de polímeros naturais é geralmente inferior e a taxa de degradação difícil de ser controlada quando comparados aos polímeros sintéticos. O ideal, portanto, é que se fabriquem *scaffolds* de copolímeros que envolvam naturais e sintéticos ou compósitos que incluam algum outro material biocompatível e/ou bioativo.

No entanto, para aproximar a resistência mecânica com a do osso, polímeros típicos ainda são insuficientes, *scaffolds* poliméricos são, portanto, acrescentados de materiais inorgânicos como metais e cerâmicas. Dentre essas duas opções as cerâmicas são preferidas porque, como dito anteriormente, metais não promovem boa integração com o tecido e a lixiviação de partículas é indesejada. Os melhores representantes da classe das cerâmicas bioativas são os fosfatos de cálcio, conhecidos por serem biocompatíveis e biodegradáveis, além de melhorarem a biomineralização, aspecto promissor para a formação óssea. Isoladamente, as biocerâmicas são rígidas, porém frágeis. Entretanto, quando incorporadas como cargas dentro de uma fase polimérica, tendem a fornecer um nível e rigidez favorável sem fragilizar significativamente o material. Além disso, *scaffolds* multifásicos são mais adequados na substituição de um tecido que apresenta anisotropia de propriedades estruturais e funcionais, um adequado gradiente de fases propicia a melhora mecânica e integridade funcional (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012).

Além de todas as características citadas acima, uma adequada seleção de células é importante para a viabilidade no novo tecido. Em testes *in vitro* são separadas células multipotentes ou do tecido específico. As células devem ser viáveis, disponíveis, fáceis de serem manipuladas e não podem induzir respostas imunitárias no hospedeiro nem transmitir doenças. Uma alternativa interessante é a utilização de células tronco mesenquimais adultas.

São disponíveis, possuem alta capacidade de proliferação e diferenciação. Além de osteócitos elas podem diferenciar-se em adipócitos, condrócitos, hepatócitos, neurônios, células musculares e epiteliais. Entretanto, devido a essa multipotencialidade, são difíceis de serem controladas. Para obter maior controle torna-se usual linhagem pré-selecionada de osteoblastos, pois essa possui menor multipotência. No entanto, ainda assim, faz-se necessário a incorporação de fatores indutivos osteocondrais no material para que este se torne osteoindutor. (PARREIRA; RESENDE, 2013; SEO *et al.*, 2015).

O corpo humano tem uma incrível capacidade de regenerar-se, em especial, o tecido ósseo; no entanto, há uma limitação fisiológica que depende da extensão da lesão. Biomateriais metálicos são excelentes alternativas para reparos, aproximação dos ossos em casos de fratura e imobilização, entretanto, para uma fixação permanente a lei de Wolff introduz algumas limitações ao uso desse tipo de material. De acordo com Wolff, a absorção de esforços pelos biomaterial implantado pode levar à fragilidade óssea, pois esse se remodela de acordo com os esforços sofridos nas atividades diárias (PETERSON, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011). Deste modo, a busca por materiais não metálicos que fiquem em contato com os tecidos ósseos por um tempo prolongado é uma linha de pesquisa muito relevante. Os materiais cerâmicos e poliméricos, ou mesmo uma associação dos dois formando um compósito apresentam-se como excelente alternativa para o reparo de lesões ósseas, não somente como materiais de fixação e imobilização, mas também como *scaffolds* para a engenharia de tecidos ou a produção de enxertos. Nesse sentido, a obtenção de um biomaterial que mimetiza o tecido ósseo constituído por um compósito cerâmico reforçado com fase polimérica é uma alternativa interessante de estudo.

3.4. Celulose

A primeira descrição da estrutura química da celulose foi feita em 1838 pelo químico francês Anselme Payen. Segundo Taipina (2012), ele a descreveu como um sólido fibroso que resistia ao tratamento de plantas com ácido e amônia e subseqüentes extrações com água, álcool e éter. O termo celulose, entretanto, só foi atribuído ao material observado em 1839.

A celulose é um dos biopolímeros mais abundantes na Terra e é predominante em plantas servindo como fase de reforço dominante, ela ainda pode ser sintetizada por fungos e bactérias. Esse biopolímero é obtido, portanto, de fontes renováveis e resíduos da

agroindústria, aumentando também o potencial de reciclagem do produto final que a utiliza. Moraes *et al.* (2016) a define como uma biomassa composta de multicamadas de microfibrilas envolvidas por uma matriz amorfa, constituída geralmente de lignina e hemicelulose. (TAIPINA, 2012; MILANEZ *et al.*, 2014; MORAES *et al.*, 2016).

A celulose, o principal constituinte, apresenta-se em ambas as estruturas amorfa e cristalina; a lignina e a hemicelulose apresentam-se amorfas. A lignina é responsável pela solidificação da parede celular e a hemicelulose funciona como uma matriz em que o componente celulósico se organiza. A Tabela 1 mostra os principais componentes de algumas fibras naturais e pode-se perceber com clareza o potencial do algodão como matéria prima para a extração de celulose (TEIXEIRA *et al.*, 2010; FAN & LI, 2012; TAIPINA, 2012).

Tabela 1 – Composição de celulose, hemicelulose e lignina em diversas fibras

Fibra	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Algodão	~90	3-6	-
Algodão comercial	~99	-	-
Juta	45-63	12-15	12-25
Rami	69	13	0,7
Sisal	50-64	10-14	10-12
Bambú	30-45	15-25	20-30
Cânhamo	60-77	10-17	3-10

FONTE: Martins *et al.* (2011); Taipina (2012) (adaptado)

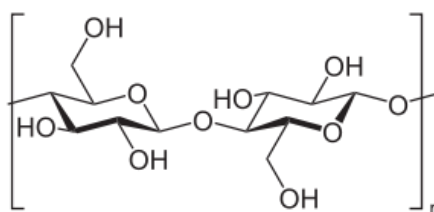
A celulose, quando na escala nanométrica, possui excepcionais características mecânicas como elevada resistência mecânica e baixa densidade, que a habilita como reforço ideal para produção de nanocompósitos mais resistentes e leves. A nanocelulose possui propriedades mecânicas superiores às das fibras de celulose convencionais porque possui elevada razão de aspecto, baixa densidade (1.5g/cm^3) e elevado módulo elástico (os nanocristais podem atingir 138 GPa). Sua incorporação em matrizes poliméricas as concedem maior estabilidade térmica e melhores propriedades de barreira, mesmo em baixas concentrações (MILANEZ *et al.*, 2014; MORAES *et al.*, 2016).

Para a sua utilização como biomaterial, são importantes as suas características de biodegradabilidade, baixo custo, disponibilidade e propriedades mecânicas como resistência a tração e módulo de Young que são adequadas à substituição de tecidos duros, como o tecido ósseo. (TEIXEIRA *et al.*, 2010; FAN & LI, 2012).

Milanez *et al.* (2014) mostra uma estimativa de que, em 2017, a nanocelulose esteja presente em 37% do mercado de compósitos.

A Figura 5 mostra a estrutura química da celulose, um dissacarídeo denominado celobiose forma a unidade de repetição e a unidade elementar é a anidro-D-glicose. Os monômeros são esterificados por ligações β -(1,4)-glicosídicas e o carbono anomérico é responsável pela formação das cadeias essencialmente lineares que resultam em uma distribuição uniforme dos grupos hidroxila (TAIPINA, 2012).

Figura 5 - Unidade de repetição da celulose



FONTE: TAIPINA, 2012. (adaptada)

Essa distribuição das hidroxilas permite que fortes interações de hidrogênio intra e intermoleculares ocorram e estabilizem os arranjos cristalinos formando um polímero rígido. Onde não ocorre orientação preferencial das hidroxilas são formadas porções amorfas. As hidroxilas livres conferem ainda um caráter predominantemente hidrofílico à celulose, enquanto que a maioria dos polímeros termoplásticos apresenta baixa polaridade.

3.4.1. Biossíntese de materiais celulósicos

A biossíntese da celulose acontece em duas etapas. Na primeira etapa ocorre formação dos dissacarídeos por ligações glicosídicas, polimerização com a formação das cadeias glucânicas e união de tais cadeias para formação de domínios cristalinos. Entretanto há variações na biossíntese que geram variações morfológicas na celulose resultando em polimorfos que variam quanto (i) a orientação das cadeias de celulose e (ii) a consequente cristalinidade das cadeias. Quando as cadeias estão dispostas com as ligações β 1-4 glicosídicas na mesma direção diz-se que são paralelas, em sentidos alternados aplica-se o termo antiparalelas (TAIPINA, 2012).

São dois os polimorfos principais. O polimorfo I é a celulose encontrada na natureza, é uma célula unitária triclinica (I_{α}), menos estável, ou monoclinica (I_{β}). Nessa forma as cadeias estão orientadas paralelamente variando-se a intensidade e os planos em que as interações de

hidrogênio ocorrem. O polimorfo II pode ser obtido por tratamento com hidróxido de sódio em concentrações elevadas ou associado a altas temperaturas ou por solubilização seguida de precipitação da celulose nativa. As cadeias do polimorfo II estão orientadas de forma antiparalela e é, por isso, mais estável em comparação ao tipo I (TAIPINA, 2012).

Pré-tratamentos são utilizados para extração dos materiais celulósicos purificados. A retirada dos componentes não celulósicos é feita por extração de ceras, branqueamento (que é a remoção da lignina) e hidrólise enzimática. Uma excelente vantagem do uso de algodão comercial como fonte de celulose é a não necessidade dessa etapa de branqueamento para a remoção de lignina.

Uma segunda etapa é realizada se o objetivo é a extração da celulose nanofibrilada e/ou cristalina, a porção com maior resistência a tração devido à cristalinidade. Nessa etapa utilizam-se métodos mecânicos, hidrólise ácida e enzimática a fim de isolar as formas microcristalina, nanofibrilada ou nanocristais de celulose. A hidrólise ácida ataca as regiões amorfas na celulose porque essas estão mais propensas ao ataque dos íons hidrônios, promovendo a clivagem hidrolítica de ligações glicosídicas. As formas obtidas dependem (i) da biossíntese, ou seja, do material escolhido como fonte de celulose e (ii) do processo de extração da celulose desse material (FAN; LI, 2012; TAIPINA, 2012).

A celulose microcristalina é preparada com a purificação da celulose natural, comumente a fonte utilizada é madeira. Esse material é composto de agregados de partículas porosas, plásticas e altamente compressíveis obtidas pela hidrólise ácida parcial das cadeias de celulose. Na hidrólise ácida, geralmente realizada com ácido sulfúrico ou através da hidrólise com ácido clorídrico combinada com desintegração mecânica, as moléculas ácidas penetram nas regiões amorfas e decompõem as ligações β -(1,4)-glicosídicas liberando microcristais de celulose em um arranjo linear rígido (DEG, 2007; FAN & LI, 2012; TAIPINA, 2012).

É possível a obtenção de fibras com diâmetro manométrico (inferiores a 100nm), mas com comprimento na escala de vários micrômetros ou nanômetros. Portanto, encontra-se na literatura o termo nanofibra para ambos os materiais; e o termo microfibra somente para aquela de comprimento na escala micro (VIANA, 2013).

Tais fibras são caracterizadas pela elevada razão de aspecto e flexibilidade. As unidades fibrilares são formadas por regiões amorfas e cristalinas alternadas, isto é, repetições

de unidades de celulose (cristalitos) ligador por domínios amorfos. (MILANEZ *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2016).

As regiões amorfas nas micro e nanofibras agem como defeitos estruturais e, quando submetidos a ataque ácido, são responsáveis pela quebra transversal das fibras em pequenos nanocristais (NCCs) e nanofibras (MORAES *et al.*, 2016). Esses cristais possuem formato de agulhas (*wiskers*) com dimensões dependentes da fonte de celulose utilizada, e elevada cristalinidade (TAIPINA, 2012; MILANEZ *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2015).

Fan e Li (2012) dissertam sobre a possibilidade da produção de NCC a partir do tratamento ácido da celulose microcristalina obtida de materiais abundantes e baratos como a madeira. Entretanto, salienta que 25 a 30% da celulose é separada como parte cristalina, muito aquém dos 70% de material cristalino contidos na celulose. Em contrapartida, em sua pesquisa utilizando tratamento ácido em algodão os rendimentos obtidos foram superiores a 60%. A Figura 6 permite perceber a diferença entre nanofibras e nanocristais. As nanofibras apresentam domínios amorfos unindo as regiões cristalinas, os nanocristais não.

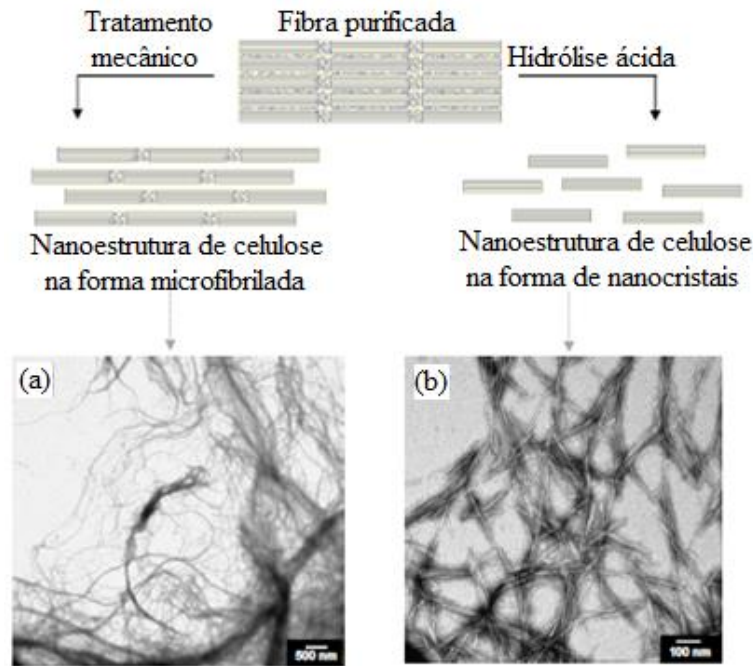
Diferentes ácidos podem ser utilizados para realizar a hidrólise ácida em fibras celulósicas. A primeira publicação sobre isolamento de NCC's com ácido sulfúrico foi feita por Ranby em 1951. O uso desse ácido produz suspensão estável de nanocristais devido à repulsão eletrostática (Figura 7), entretanto, provoca a incorporação de grupos sulfatos na superfície da celulose após a hidrólise, essa incorporação exerce efeito catalítico nas reações de degradação térmica. A substituição de hidroxilas por grupos sulfatos também diminui a energia de ativação para degradação das cadeias. O uso de ácido clorídrico por sua vez aumenta a estabilidade térmica, mas repetidas lavagens com água retiram os cloretos e a ausência de forças eletrostáticas mantendo a repulsão de partículas as permitem formar agregados (TEIXEIRA *et al.*, 2010; TAIPINA, 2012).

Diversos fatores influenciam na eficiência da hidrólise ácida. Fan e Li (2012) avaliaram os efeitos de diferentes condições de processamento: diferentes graus de batimento no picotamento inicial das fibras, concentrações de ácido sulfúrico, tempos de reação e temperaturas na produção de NCC a partir de fibra de polpa de algodão. Taipina (2012) relata que a relação ácido/matéria prima é acrescida na avaliação de muitos autores.

A Tabela 2 contém valores de resistência à tração e módulo de Young que comparam as propriedades mecânicas de ambas as estruturas celulósicas mostradas na Figura 7 em relação a outras cargas utilizadas como reforço em matrizes poliméricas. As NFC possuem

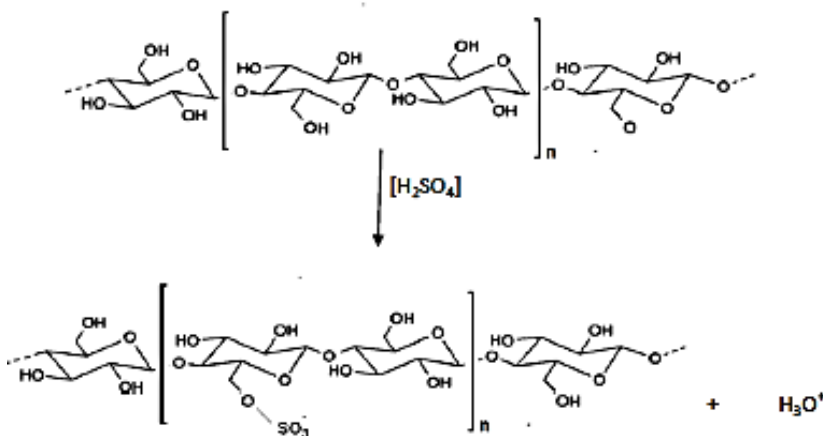
propriedades mecânicas de resistência à tração e módulo de Young superiores aos nanocristais de celulose e às fibras de vidro e resistência à tração semelhante às fibras de carbono e maior que Kevlar.

Figura 6 - Obtenção da celulose microfibrilada e nanocristalina a partir da fibra purificada.



FONTE: Taipina (2012)

Figura 7 - Representação da inserção do grupo sulfato proveniente da hidrólise com H_2SO_4 na cadeia de celulose



FONTE: Taipina (2012)

Tabela 2 - Valores de resistência à tração e módulo de Young de algumas cargas utilizadas como reforço de matrizes poliméricas

Material	Resistência à tração (MPa)	Módulo de Young (GPa)
Nanocristais de celulose	7,5	150
Nanofibra de celulose	~10	~100
Fibra de vidro	4,8	86
Kevlar	3,8	130
Nanotubo de carbono	11-73	270-970

FONTE: Taipina (2012)

Os valores mostrados na tabela associados à elevada área superficial e elevada razão de aspectos nas NFC a caracterizam com excelente aplicação para serem usadas como carga de reforço porque quando dispersas se aderem bem à matriz e transmitem o reforço mecânico.

3.5. Fosfatos De Cálcio

De Jong em 1926, foi o primeiro a observar, através de difração de raios X, que os cristais sólidos inorgânicos que constituíam 65% da massa do osso se assemelhavam com fosfatos de cálcio (CaPs) e tinham uma razão Ca/P bem próxima da hidroxiapatita (HA). De Jong notou a presença dos íons Na^+ , Mg^{2+} , CO_3^{2-} , K^+ , F^- e Cl^- , esses três últimos em menor quantidade, e classificou-a como uma hidroxiapatita carbonatada com a seguinte composição química (GUASTALDI; APARECIDA, 2010):



\square representa as possíveis substituições catiônicas

A biocompatibilidade dos CaPs se deve a sua composição semelhante à fase mineral de ossos, dentes e tecidos calcificados. Esses materiais são solúveis em água, possibilitando a troca de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} com o meio biológico, facilitando o crescimento e regeneração óssea. A solubilidade decresce com o aumento da razão Ca/P. Além disso, esses materiais não são tóxicos, são bioativos, osteocondutores, biodisponíveis, facilmente esterilizáveis e ainda possuem taxas de degradação lentas e previsíveis, facilmente modificáveis com ajustes na composição química. Tais características os tornaram interessantes para aplicações biomédicas em que é desejável manter ligação entre o osso e o implante. A Tabela 3 contém a fórmula química, a razão Ca/P e a ocorrência dos principais tipos de CaPs no organismo

(GUASTALDI; ERGUN *et al.*, 2011; PICARD *et al.*, 2013; APARECIDA, 2010; KEIL *et al.*, 2015).

Tabela 3 - Razão Ca/P e ocorrências de fosfatos de cálcio em sistemas biológicos

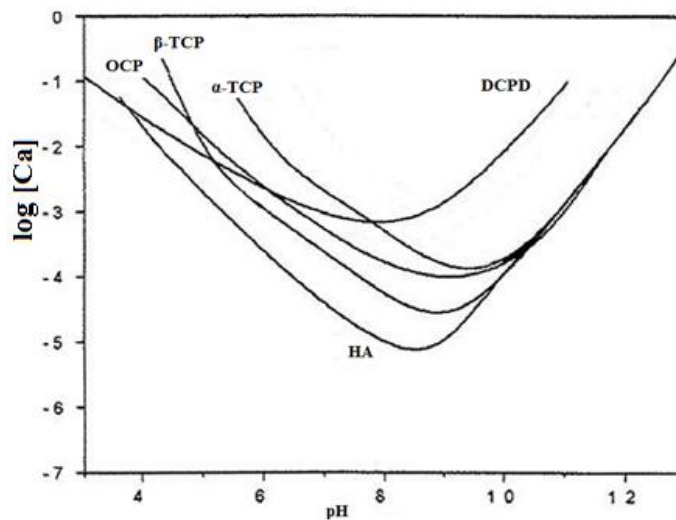
Fosfatos de cálcio	Fórmula química	Ocorrência	Ca/P
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Esmalte, dentina, osso, cálculo dentário e urinário	1,67
Fosfatos de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Cálculo dentário e urinário	1,50
Fosfatos tricálcico (α , α' , β , γ) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Cálculo dentário e urinário	1,50
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Cálculo dentário, ossos decompostos	1,33
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cálculo dentário e urinário, pedras salivares, cáries dentárias. Calcificação de tecido mole	1,00
Pirofosfato de cálcio di-hidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Depósitos de pseudo-gotas em fluidos	1,00

Fonte: GUASTALDI; APARECIDA (2010). (Adaptado).

3.5.1. Síntese

A síntese dos fosfatos de cálcio geralmente é feita em meio ácido a partir de soluções contendo íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} . Entretanto, compostos que apresentam os grupos HPO_4^{2-} e PO_4^{3-} podem também serem obtidos em meio alcalino. A Figura 8 mostra uma isoterma de solubilidade do cálcio em relação ao pH da solução. A inclinação negativa inicial indica que a concentração de cálcio vai reduzindo-se na solução com o aumento do pH, isto é, os compostos vão se tornando menos solúveis. Na região alcalina a concentração de cálcio aumenta, os compostos são mais solúveis. Dessa forma, em pH fisiológico (aproximadamente 7,4) a solubilidade dos fosfatos de cálcio e, conseqüentemente, sua degradação *in vivo*, é dada na seguinte ordem: α -TCP>DCPD>OCP> β -TCP>HA. Além disso, infere-se que fosfatos de cálcio tendem a degradar em fluidos corporais quando há resposta de cicatrização de feridas tornando o meio ácido e/ou pela atividade celular em pHs baixos (GUASTALDI; APARECIDA, 2010; ERGUN *et al.*, 2011).

Figura 8 - Diagrama de solubilidade para o sistema ternário $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ a 37°C



Fonte: GUASTALDI; APARECIDA, 2010.(Adaptado).

3.5.2. Principais fosfatos de cálcio (CaP)

Hidroxiapatita (HA)

A hidroxiapatita, cuja fórmula molecular é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, possui propriedades comuns aos demais CaPs, tais como: ausência de toxicidade, biocompatibilidade e osteocondutividade. Entretanto, seu baixo índice de bioatividade (I_b) e sua lenta taxa de degradação, podendo começar a se degradar após 4 ou 5 anos da data de colocação do implante, são fatores limitantes à sua utilização (GUASTALDI & APARECIDA, 2010).

O índice de bioatividade, I_b , é definido por Guastaldi e Aparecida (2010) como o tempo necessário para que ocorram 50% de ligações interfaciais entre o biomaterial e o tecido. A Tabela 4 compara o índice de bioatividade da HA com outros biomateriais. Os materiais osteoindutores formam a classe A com I_b maior que 8, estes promovem respostas intra e extracelulares induzindo a colonização de sua superfície por células progenitoras. I_b menores que 8 formam a classe B dos materiais que são apenas osteocondutores. Picard *et al.* (2013) os definem como substratos para deposição de osso, mas que não podem por si induzir a diferenciação osteogênica.

Tabela 4 - Índice de bioatividade (I_b) de diferentes biomaterias

Biomaterial	I _b	Classe de bioatividade	Ligação com osso	Ligação com tecido mole
Vidro Bioativo (4555)	12,5	A	Sim	Sim
Vidro Bioativo (5254)	10,5	A	Sim	Sim
Cerâmica Bioativa (AW)	6,0	B	Sim	Não
Hidroxiapatita (HA)	3,1	B	Sim	Não
Alumina	0	-	Não	Não

Fonte: GUASTALDI & APARECIDA, 2010.

A hidroxiapatita apresenta I_b de 3,1, ou seja, é um material classe B, com características osteocondutoras. Guimarães *et al.* (2011) ressalta que os osteocondutores são eficazes porque mesmo não tendo a capacidade de induzir a citodiferenciação, preenchem o defeito, orientam as novas células e promovem a neoformação do tecido ósseo. Picard *et al.* (2013) entretanto, observa que pesquisas mais recentes apontam alguns CaPs como osteoindutores, a percepção primária é que esses materiais agem como substratos para adsorção e retenção de fatores biológicos que induzem a diferenciação osteogênica. Mas a osteoindução continua não sendo uma característica intrínseca ao material, ela ocorre devido a sua topografia e porosidade.

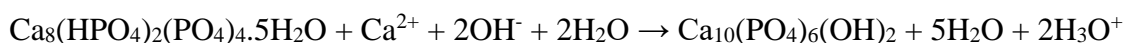
A HA cristaliza-se no sistema hexagonal compacto e dos CaPs citados apresenta a maior cristalinidade e, portanto, em condições fisiológicas, a menor propensão a degradação (GUASTALDI; APARECIDA, 2010). Guastaldi e Aparecida (2010) citam várias características que se alteram com a substituição do cálcio e fosfato por outros íons na HA uma vez que, como percebido por De Jong, sua forma biológica não é estequiométrica. Tais substituições alteram cristalinidade, parâmetros de rede, dimensões dos cristais, textura superficial, estabilidade e solubilidade; afetam, portanto, a degradabilidade e o comportamento *in vivo* dessa substância. Em geral, pode-se dizer que a cristalinidade é inversamente proporcional à taxa de degradação. A HA carbonatada do tipo A, com dilatação do cristal, tem o sítio OH⁻ substituído pelo CO₃²⁻, quando esse íon substitui o PO₄³⁻ obtém-se a HA carbonatada do tipo B, com contração do cristal. Hidroxiapatitas são, portanto, reservas disponíveis de cálcio e fósforo devido à facilidade de suas substituições. Sua interação com proteínas se dá através de interação elétrica dos seus grupos PO₄³⁻ com os grupos NH₄⁺ das proteínas de ponto isoeletrico superiores a 8. Para proteínas ácidas a adsorção ocorre com a formação do complexo HA – Ca²⁺... -OOC – proteína.

Fosfato de cálcio amorfo (ACP)

A estrutura amorfa dos fosfatos de cálcio de composição $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ faz deles materiais facilmente degradáveis. ACP é uma fase metaestável intermediária durante a formação de CaPs em meios aquosos, com pH neutro ou alcalino; e biológicos, na mineralização dos tecidos. A cristalização de cristais de HA *in vitro* ocorre na seguinte sequência: ACP transforma-se em OCP que por sua vez se transforma em HA deficiente de cálcio ($\text{Ca}_9\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot n\text{H}_2\text{O}$). ACP também tem possibilidades de substituições catiônicas e aniônicas, entretanto, com menos possibilidades de substituições do que a HA e são mais solúveis do que essas (GUASTALDI & APARECIDA, 2010; ERGUN *et al.*, 2011).

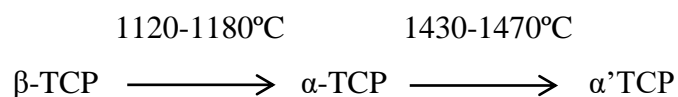
Fosfato octacálcio (OCP)

OCP também é uma fase metaestável. A estrutura cristalina do OCP é triclínica. Esse fosfato de cálcio faz substituição iônica com maior facilidade do que a HA quando os íons são Cd^{2+} , Cu^{2+} e F^- . Devido à sua maior velocidade de reabsorção em relação a HA, a OCP é considerada mais osteocondutiva e mais adequada em aplicações ósseas onde se requer rápida formação do tecido. Esse fosfato de cálcio também adsorve proteínas tão bem quanto a HA e transforma-se irreversivelmente nessa substância com o consumo de Ca^{2+} do fluido biológico seguindo a equação abaixo (GUASTALDI; APARECIDA, 2010):



Fosfato tricálcio (TCP)

Os fosfatos tricálcio são comuns em calcificações patológicas. Apresentam-se em quatro formas alotrópicas: β -TCP, α -TCP, α' -TCP e γ -TCP. Esta última é obtida em altas pressões e, devido às dificuldades de preparação, suas características não são exploradas. A fase α é monoclínica, as fases β e α' são romboédricas. As três primeiras possuem as seguintes temperaturas de transição:



O TCP permite que até 15% dos íons cálcio sejam substituídos por Mg^{2+} formando β -TCP substituído por magnésio. A osteocondução das fases β -TCP e α -TCP são semelhantes, mas a última é mais bioativa. O TCP possui taxa de degradação elevada em relação a HA, isso se torna uma limitação às suas aplicações (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

Fosfatos de cálcio bifásicos (BCPs)

Diante de todas as informações coletadas sobre os principais fosfatos de cálcio é possível concluir que TCP e HA possuem limitações que são um desafio à engenharia de tecidos. Para sanar essas limitações muitos pesquisadores estudam sistemas bifásicos que unem TCP e HA. Diferentes concentrações de β -TCP e HA são utilizadas na formação de um compósito que, embora tenha composição semelhante de fases, une propriedades distintas de ambas as estruturas (ERGUN *et al.*, 2011; MARCHI *et al.*, 2013; KEIL *et al.*, 2015).

Anteriormente mencionou-se que os CaPs variam sua taxa de degradação de acordo com a razão Ca/P, cristalinidade e mudanças na estrutura cristalina feitas por átomos substitucionais. De forma semelhante, Keil *et al.* (2015) salientam que a degradação e a bioatividade dos BCPs é controlada pela composição química, isto é, pela razão β -TCP/HA, que igualmente se relaciona à razão Ca/P e aos parâmetros de cristalinidade dos fosfatos que os compõem. Esses autores, no entanto, não desconsideram que a macro e a microestrutura, bem como fatores do hospedeiro podem influenciar em tais propriedades. Ergun *et al.* (2011) especificam que essas características micro e macroestruturais são composição elementar, topografia da superfície, porosidade, densidade, forma e tamanho do biomaterial.

Como já descrito, a temperatura afeta a estabilidade da HA transformando-a inicialmente em β -TCP. Associando a influência da temperatura à razão β -TCP/HA, Ergun *et al.* (2011) realizaram um estudo que permitiu avaliar as fases formadas em nanomateriais de fosfatos de cálcio, fabricados através do método de precipitação, variando a estequiometria e temperatura de sinterização. Com a variação das razões estequiométricas e sinterizações feitas até 700°C, as seguintes fases foram formadas: β -TCP e $Ca_2P_2O_7$ ($0,5 < Ca/P < 0,75$), β -TCP + HA (Ca/P = 1,55), HA (Ca/P = 1,65) e HA + CaO (Ca/P > 2,00). Para baixas razões Ca/P a ausência de cálcio no sistema favoreceu a formação de fosfatos de cálcio com menor quantidade estequiométrica desse elemento e, mesmo a elevadas temperaturas (acima de 900°C), não houve formação de mais β -TCP porque não havia cálcio disponível no sistema.

Em condições em que houve formação de HA, formou-se β -TCP com aquecimento a elevadas temperaturas porque essa última se tornou a fase mais estável. A elevada concentração de cálcio no sistema, por sua vez, proporcionou a formação de CaO, com a temperatura de sinterização acima de 900°C mais CaO foi formado, devido ao aumento da reatividade com o oxigênio, mas também como subproduto da decomposição térmica da HA.

Marchi *et al.* (2013) avaliaram para diferentes razões de β -TCP/HA a biocompatibilidade *in vitro* através da utilização de culturas de fibroblastos. As conclusões de seu trabalho apontam que um aumento na quantidade de β -TCP aumenta a biocompatibilidade, sua superfície tem maior rugosidade e menor densidade induzindo uma reatividade inicial maior. Entretanto, como TCPs são degradáveis rapidamente, os autores sugerem o uso de matrizes de BCP revestidas com TCP para uma osteointegração mais rápida, mas com permanência de um implante de longa vida. Ergun *et al.* (2011), entretanto, alerta quanto ao uso de revestimento de implantes que degradam facilmente. A degradação da superfície de forma acelerada pode ocasionar perda de estabilidade no implante levando a formação de cápsulas fibrosas e possível rejeição do material.

Obter uma fase pura de HA como revestimento e/ou carga, além de indesejável devido à longa vida, é muito difícil. Muitos processos podem levar a heterogeneidade nas razões Ca/P desviando do padrão estequiométrico 1,67 da HA conduzindo a uma falta de pureza. Decomposições térmicas da HA também podem levar à formação de TCP e a reação com o oxigênio leva a formação de óxido de cálcio. Portanto, evitar o processo complexo de se obter fases puras é uma vantagem na produção de bifásicos (ERGUN *et al.*, 2011).

Fosfatos de cálcio bifásicos apresentam excelente biocompatibilidade e bioatividade. Através de mudanças no controle de processo de síntese podem ser fabricados com previsibilidade do tempo de degradação e ainda serem adicionados como carga a fim de melhorar as características biodegradativas de suas matrizes. Aliado a todos esses fatores, mimetizam muito bem o tecido ósseo sendo, portanto, um excelente material para produção de enxertos ósseos ou *scaffolds* que reparem esse tecido.

Diante do exposto e visando a produção de um material poroso para possível recuperação tecidual óssea foram produzidos compósitos de fosfato de cálcio bifásico (BCP) reforçados com nanofibras de celulose (NFC) em duas diferentes proporções (60:40 e 75:25), proporções que são semelhantes à fase inorgânica e orgânica da matriz óssea. O BCP utilizado foi produzido pela aluna de iniciação científica Jéssica Pauline através da técnica de co-

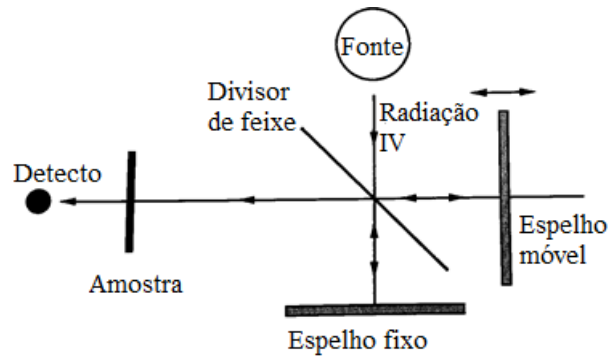
precipitação do fosfato de cálcio monofásico e hidróxido de cálcio seguido de sinterização a 950°C. Após produção, o BCP foi caracterizado através das técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Difração de RaiosX (DRX) e Granulometria a Laser (resultados não mostrados). As nanofibras de celulose foram produzidas através de hidrólise ácida do algodão comercial e incorporadas à matriz de BCP no intuito de aumentar a flexibilidade, degradabilidade e bioatividade do material resultante. As nanofibras de celulose e as matrizes porosas produzidas foram submetidas à caracterização físico-química. Para as NFC as seguintes técnicas de caracterização foram realizadas: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Difração de RaiosX (DRX). Já as matrizes porosas foram caracterizadas através de: FTIR, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Ensaios de Molhabilidade e obtenção de isotermas de Brunauer, Emmett e Teller (BET).

3.6. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

3.6.1. Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier – FTIR

FTIR é uma espectroscopia em que a transformada de Fourier é utilizada para obtenção de um espectro infravermelho (IV) em todo o alcance de comprimento de ondas simultaneamente. O principal componente do equipamento é o interferômetro de Michelson (Figura 9). O interferômetro é composto por um divisor do feixe de IV que transmite metade do feixe e reflete a outra metade, um espelho que recebe o feixe transmitido e outro que recebe o feixe refletido. Ambos os feixes são refletidos pelo espelho e se combinam novamente a fim de irradiar a amostra e serem recebidos por um detector. Um dos espelhos é móvel e possibilita mudar o caminho ótico do feixe a fim de gerar interferência entre os feixes. Se a mudança corresponde a um número inteiro (n) de comprimento de onda (λ), a interferência é construtiva, se corresponde a $(n + 1/2)\lambda$ a interferência é completamente destrutiva (LENG, 2009).

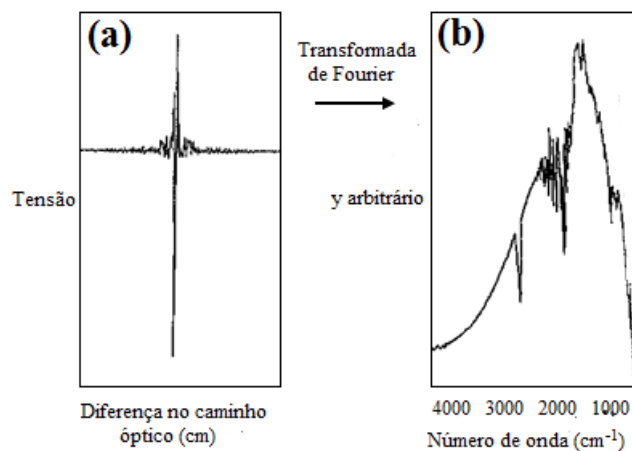
Figura 9 - Diagrama do interferômetro de Michelson



Fonte: LENG, 2009. (Adaptada)

A intensidade da interferência de luz como função da diferença do caminho óptico é plotada em um gráfico chamado interferograma. O interferograma é a soma das ondas sinusoidais em um elevado número de comprimentos de onda (Figura 10a). Percebe-se que o centro do gráfico corresponde à região em que os espelhos proporcionam a maior interferência construtiva. A transformada de Fourier é então aplicada para converter o gráfico em um espectro de IV, a mudança é feita de intensidade versus caminho óptico para intensidade versus número de onda (Figura 10b). O caminho óptico está em um domínio de tempo porque é obtido multiplicando o tempo com a velocidade de movimento do espelho. O número de onda está no domínio da frequência porque é igual à frequência dividida pela velocidade da luz (LENG, 2009).

Figura 10 - Interferograma e interferograma com transformada de Fourier



Fonte: LENG, 2009. (Adaptada)

O espectro de IV convertido é chamado de espectro de feixe simples e inclui dados de intensidade da amostra (I) e da atmosfera (I_o) do equipamento. A razão entre as intensidades de ambos deve ser feita para eliminar a influência da atmosfera do equipamento. O gráfico resultante é o espectro de transmitância (T) (Equação 1). Para que o gráfico seja feito com absorvância (A), basta realizar a conversão (Equação 2) (LENG, 2009).

$$\left(T = \frac{I}{I_o}\right) \quad \text{(equação 1)}$$

$$(A = -\log T) \quad \text{(equação 2)}$$

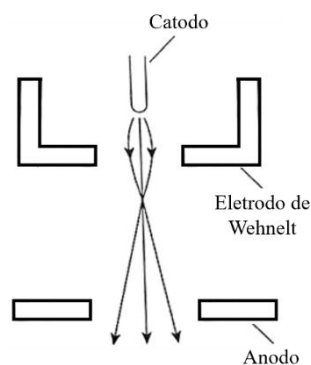
A partir da análise dos interferogramas pode-se obter informações sobre a composição química das amostras, definida pela natureza dos átomos e o tipo de ligação do arranjo espacial entre eles. A absorção de luz é influenciada pelas excitações vibracionais moleculares. Estruturas configuracionais caracterizam o estado químico e a conformação dos grupos químicos caracterizam a geometria do composto e suas interações moleculares.

3.6.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET

Em um microscópio eletrônico de transmissão (MET), o processo de formação de imagem não ocorre com luz visível e lentes de vidro como em um microscópio óptico. A fonte de luz é um feixe de elétrons e lentes eletromagnéticas fazem a captura dos elétrons emitidos após contato com a amostra. O comprimento de onda do elétron é cerca de dez mil vezes menor do que o da luz visível. A resolução da imagem, portanto, pode alcançar a ordem de 0,1 nm (LENG, 2009).

No sistema do MET, um canhão de elétrons gera um feixe de elétrons (e) de elevada energia (E) para iluminação. Nesse canhão, o feixe de elétrons é emitido por um catodo e acelerado por uma elevada tensão (V). A energia pode ser calculada como $E=eV$. O canhão (Figura 11) é composto de catodo (fonte de elétrons), eletrodo de Wehnelt e anodo. Um campo elétrico acelera os elétrons do catodo até o anodo. Algumas centenas de volts são necessárias para estabilizar o feixe de elétrons contra flutuações quando for necessário que o mesmo seja reduzido em intensidade (LENG, 2009).

Figura 11 - Estrutura geral do canhão de elétrons



FONTE: LENG (2009)

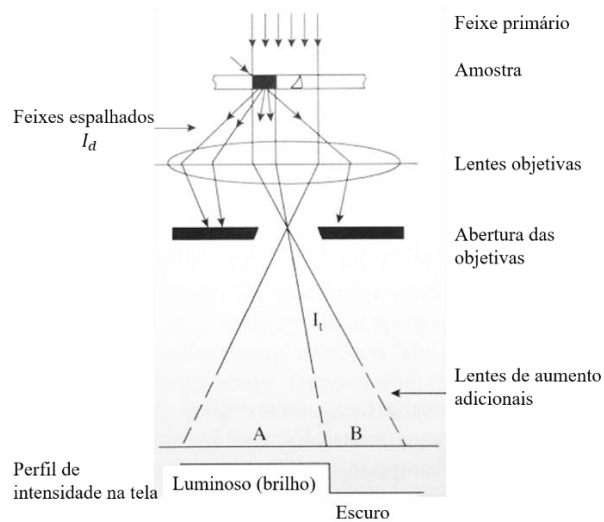
Os elétrons emitidos interagem com os átomos da amostra analisada, quando colidem com um núcleo atômico, ocorre um desvio no caminho. O espalhamento de elétrons depende da densidade e espessura do material em determinado ponto. Um ângulo de espalhamento superior à ordem de 0,01 radianos é bloqueado pelo anel de abertura e percebido pelas lentes objetivas que ficam logo acima desse anel. A abertura, portanto, controla a intensidade de transmissão do feixe de elétrons. A intensidade do feixe de elétrons deixando a superfície da amostra e chegando a abertura determina o brilho da imagem (Figura 12). Dessa forma, a equação 3 determina a intensidade do feixe de elétrons transmitidos (I_t) de acordo com a intensidade do feixe de elétrons primários (I_o) e defletidos (I_d), e a equação 4 dá o contraste da imagem. O contraste é maior quando dois pontos distintos da imagem podem ser identificados em uma distância menor entre eles (LENG, 2009).

$$I_t = I_o - I_d \quad (\text{equação 3})$$

$$C = (I_o - I_t)/I_o \quad (\text{equação 4})$$

As amostras do ensaio devem ser finas a ponto de conduzir elétrons, isto é, serem eletronicamente transparentes. O suporte para que a amostra seja fixada é um disco de 3 mm de diâmetro, amostras menores do que isso são suportadas por uma grade quadriculada de carbono com 3 mm de diâmetro que as impede de cair na coluna de vácuo do microscópio. Amostras ainda menores exigem que malhas com orifícios menores sejam fabricadas, usualmente são utilizadas malhas de cobre cobertas com uma fina camada de carbono amorfo (LENG, 2009).

Figura 12 - Arranjo óptico para contraste relacionado à massa e densidade da amostra



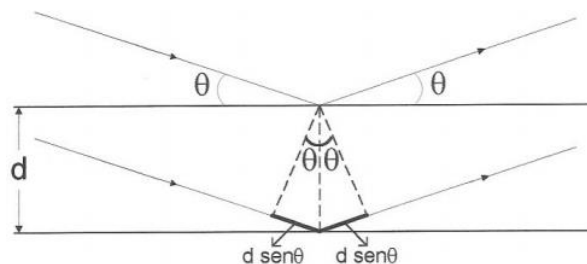
LENG (2009)

3.6.3. Difração de RaiosX - DRX

A difração de raiosX é uma técnica não destrutiva e utilizada para identificação de fases cristalinas em uma amostra. Quando um feixe de raiosX incide sobre um cristal, este interage com os átomos da amostra levando a um espalhamento de elétrons e gerando difração, isso ocorre porque os planos cristalográficos se orientam com espaçamentos de mesma ordem de grandeza do comprimento de onda dos raiosX. A Lei de Bragg, equação 5, descreve esse fenômeno de difração, onde: n é um número inteiro, λ é o comprimento de onda dos raios incidentes, d é a distância interplanar e θ é o ângulo de difração conforme Figura 13 (ALBERTS *et al.*, 2002).

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (\text{equação 5})$$

Figura 13 - Representação da Lei de Bragg



FONTE: AMORIM, 2007

O difratograma, gráfico que apresenta os resultados, é obtido através de um detector que detecta o feixe difratado. Ele relaciona a intensidade de radiação medida pelo detector com o ângulo formado entre o feixe incidente e o espalhado (2θ), também chamado de ângulo de espalhamento. Cada constituinte cristalino diferente em uma amostra produz um ângulo de espalhamento característico que gera um pico no difratograma (AMORIM, 2007).

As ondas espalhadas devem estar em fase, interagindo construtivamente. Adicionalmente, $2d \sin \theta$, deve ser um múltiplo inteiro de comprimentos de onda, essa condição é atendida quando um conjunto de planos do cristal satisfaz a Lei de Bragg. Operacionalmente, seleciona-se o ângulo e a velocidade de varredura no equipamento (AMORIM, 2007).

3.6.4. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

O MEV utiliza feixe de elétrons permitindo resolução muito maior do que a alcançada com a luz branca proveniente de fótons em microscópios ópticos. Usualmente, utiliza-se resolução na ordem de 2 a 5 nm. Além disso, o equipamento apresenta elevada profundidade de campo dando às amostras aparência tridimensional. Fornece, portanto, informações detalhadas sobre a morfologia de uma amostra sólida (LENG, 2009).

Um feixe de elétrons acelerado pela alta tensão entre a fonte de elétrons e uma tela receptora catódica, de diâmetro reduzido, que pode ser guiado seguindo uma malha retangular, varre a superfície da amostra ponto a ponto. A maioria dos equipamentos utiliza um filamento de tungstênio aquecido como fonte de elétrons. As informações são detectadas pela tela catódica cuja varredura está sincronizada ao feixe incidente (LENG, 2009).

O volume de elétrons na interação entre o feixe e a amostra dependerá da tensão de aceleração dos elétrons e do número atômico da amostra. A análise físico-química e as imagens são feitas através dos elétrons e ondas eletromagnéticas produzidas. Partículas e raios eletromagnéticos derivados da interação entre feixe e amostra retornam à superfície, atingem o detector com certa energia, tal energia se relaciona com a profundidade máxima de detecção. Os elétrons secundários e/ou retroespalhados são comumente utilizados para gerar sinais que levarão a formação de imagens. O segundo possui maior energia fazendo com que o detector de elétrons retroespalhados opere na faixa de energia maior que o de elétrons



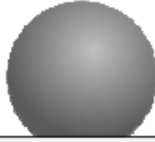

secundários. A amostra deve ser condutora, caso contrário, uma camada de ouro é utilizada para metalizar a amostra (LENG, 2009).

3.6.5. Ângulo de Contato

O ângulo de contato é uma medida quantitativa da molhabilidade de um sólido. Ele é definido como o ângulo entre a tangente à superfície do líquido até a linha de encontro das três fases no plano da superfície sólida. Instrumentos modernos capturam imagem da gota e traçam o seu perfil, ligando posteriormente a tangente à gota ao ponto de encontro das três fases: superfície sólida, líquido (gota) e gasosa. Portanto, o ângulo de contato depende do equilíbrio termodinâmico dessas três fases (OGEDA 2010; DRELICH, 2013).

As superfícies são regiões de maior energia, as forças atrativas e repulsivas entre átomos do sólido não estão em equilíbrio na superfície. Como a natureza sempre tende ao estado de menor energia, a adesão entre os materiais é melhor quando maiores forem as energias superficiais envolvidas. Quatro situações possíveis de resultados são mostradas na Figura 14.

Figura 14 - Ângulos de contato de líquidos com superfícies sólidas

Regime	Super-hidrofílico	Hidrofílico	Hidrofóbico	Super-hidrofóbico
Diagrama da gota				
Ângulo de contato	$\theta < 10^\circ$	$\theta < 90^\circ$	$\theta > 90^\circ$	$\theta > 150^\circ$

FONTE: OLIVEIRA, 2011

Na análise, uma gota em contato com uma superfície sólida que deve estar lisa, limpa e estável quimicamente e dimensionalmente. A gota se espalha sobre a superfície de acordo com as possíveis interações formadas entre as moléculas do líquido e a superfície. Para biomateriais a molhabilidade é importante porque permite a penetração de líquidos extracelulares que criam um ambiente no implante que mimetiza melhor o tecido (OGEDA, 2010; DRELICH, 2013).

3.6.6. Área Superficial e Porosidade Pelo Método de Brunauer, Emmett e Taller (BET)

O ensaio BET, baseado na teoria desenvolvida por Stephen Brunauer, Paul Hugh Emmett e Edward Teller, tem como função determinar a área superficial e a distribuição de tamanho de poros em uma amostra sólida através da adsorção física de moléculas gasosas sobre ela. A relação entre a quantidade adsorvida e a pressão de equilíbrio do gás a uma dada temperatura forma a isoterma de adsorção. O tamanho das moléculas do gás, bem como a acessibilidade dos poros são fatores que influenciam os resultados obtidos. Os poros da amostra são classificados de acordo com o tamanho em: macroporos (acima de 50 nm), mesoporos (entre 2 e 50 nm), e microporos (inferiores a 2nm) (SING *et al.*, 2008).

A equação 6 mostra o cálculo da área superficial (A_s) da amostra, feito em função da capacidade da monocamada (n_m^a), e da área que uma molécula de adsorbato, gás de adsorção, ocupa (a_m). A capacidade da monocamada é a quantidade de molar de moléculas gasosas necessárias para formar uma camada única na superfície do material. L é a constante de Avogadro. A equação 7 permite o cálculo da área superficial específica, onde m é a massa do material (SING *et al.*, 2008).

$$A_s = n_m^a \cdot L \cdot a_m \quad (\text{equação 6})$$

$$a_s = A_s / m \quad (\text{equação 7})$$

Dois métodos podem ser utilizados nesta técnica. O método volumétrico é o mais utilizado e baseia-se na quantidade de gás admitido em uma câmara não expansível. Quando a adsorção ocorre, a pressão cai até se estabilizar, a diferença entre a quantidade de gás admitido na câmara e a quantidade necessária para ocupar o volume ao redor da amostra (espaço morto) fornece a quantidade de gás adsorvido na amostra. O método gravimétrico baseia-se no ganho de massa que a amostra apresenta durante o ensaio, no entanto, esse método demanda o uso de balanças muito precisas (SING *et al.*, 2008).

Inicialmente faz-se necessária a remoção de espécies contaminantes que possam estar adsorvidas à amostra, para tal, a superfície é exposta a vácuo e elevadas temperaturas. O ensaio geralmente é feito com nitrogênio a 77K. A cada inserção de gás e estabilização da pressão, um ponto é coletado. A isoterma resultante segue a equação 8 em que C é a constante de BET e está exponencialmente relacionada com a entalpia de adsorção na primeira camada

de átomos do gás; p é a pressão medida em equilíbrio; p^o é a pressão inicial do sistema; n^a é a quantidade adsorvida na pressão relativa p/p^o ; e n_m^a é a capacidade da monocamada (SING *et al.*, 2008).

$$\frac{p}{n^a(p^o - p)} = \frac{1}{n_m^a C} + \frac{(C-1)p}{n_m^a C p^o} \quad (\text{equação 8})$$

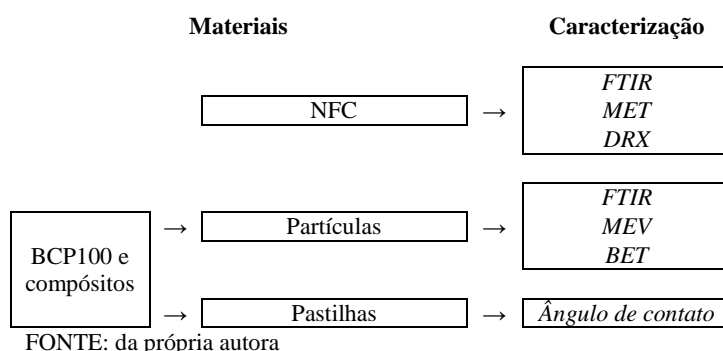
Para cálculo do diâmetro do poro, assume-se que o gás adsorvido se encontra condensado em um estado líquido normal. O diâmetro do poro é calculado de acordo com a equação 9, onde d_p é o diâmetro do poro, r_k é o raio de Kelvin e t é a espessura das multicamadas formadas. r_k é função de p/p^o , temperatura, a tensão superficial do líquido condensado e seu volume molar. E a curvatura do menisco do líquido presente nos poros (SING *et al.*, 2008).

$$d_p = r_k + 2t \quad (\text{equação 9})$$

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os seguintes materiais e métodos foram utilizados para o preparo e caracterização das amostras de trabalho. O fluxograma mostrado na figura 15 explicita as etapas seguidas. Inicialmente foram preparadas as NFC e estas foram caracterizadas. Posteriormente foram feitas as partículas e pastilhas da amostra controle BCP100 e os compósitos de BCP com NFC. Todas as técnicas e procedimentos apresentados ao longo desse trabalho seguem a ordem cronológica do fluxograma abaixo.

Figura 15 - Fluxograma das etapas de trabalho



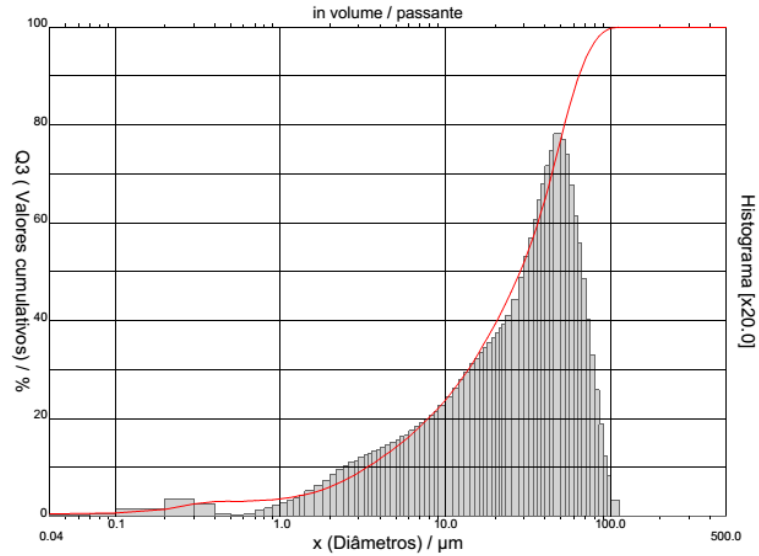
4.1. Materiais

Os materiais utilizados na hidrólise ácida do algodão comercial da marca Carrefour® foram ácido clorídrico 37% P.A. da marca NEON, ácido sulfúrico P.A. da marca Raegen e água destilada. Na fase posterior de neutralização da solução foi utilizado hidróxido de sódio da marca Anidrol. Na preparação dos compósitos foi utilizado o detergente TritonTM-X100 da Sigma Aldrich.

A síntese e caracterização do fosfato de cálcio bifásico foi feita pela aluna de Iniciação Científica Jéssica Pauline Nunes Marinho do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, que utilizou as técnicas de DRX para determinar o grau de cristalinidade e o ensaio granulométrico para identificar a distribuição e tamanho das partículas. A difratometria foi feita em difratômetro de raiosX Shimadzu, modelo XR-7000, operando com radiação de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$), tensão de 30kV e corrente de 15 a 40mA. Os difratogramas foram obtidos à temperatura ambiente com ângulo de varredura de 10 a 80° (2θ) e passo de 0,02° a

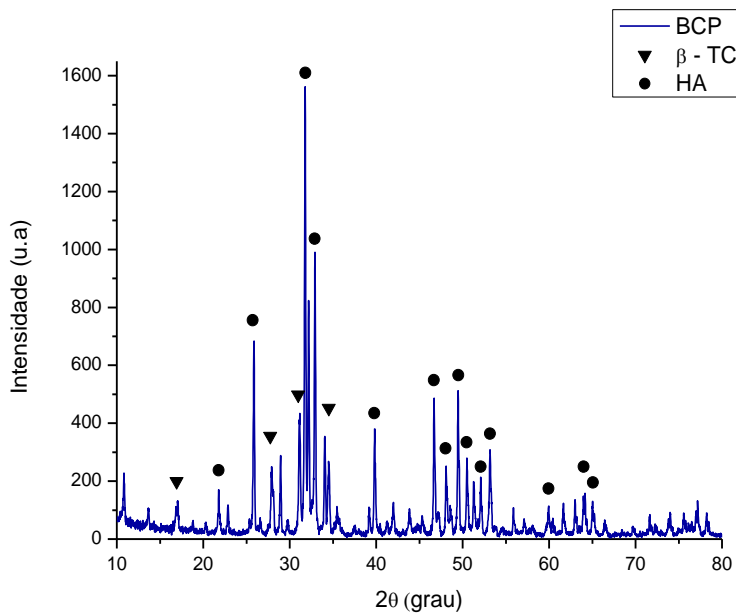
cada 40 segundos. O DRX mostrado na figura 16 apresentou picos característicos da hidroxiapatita (HA) e beta trifosfato de cálcio (β -TCP). A análise granulométrica foi feita em granulômetro a laser Cilas 1090. O Tamanho médio das partículas de BCP é 31,36 μ m como mostra o gráfico da figura 17. Ambos os equipamentos pertencem ao CEFET-MG.

Figura 16 - Distribuição Granulométrica das partículas de BCP



FONTE: MARINHO, 2016.

Figura 17 - DRX das partículas de BCP

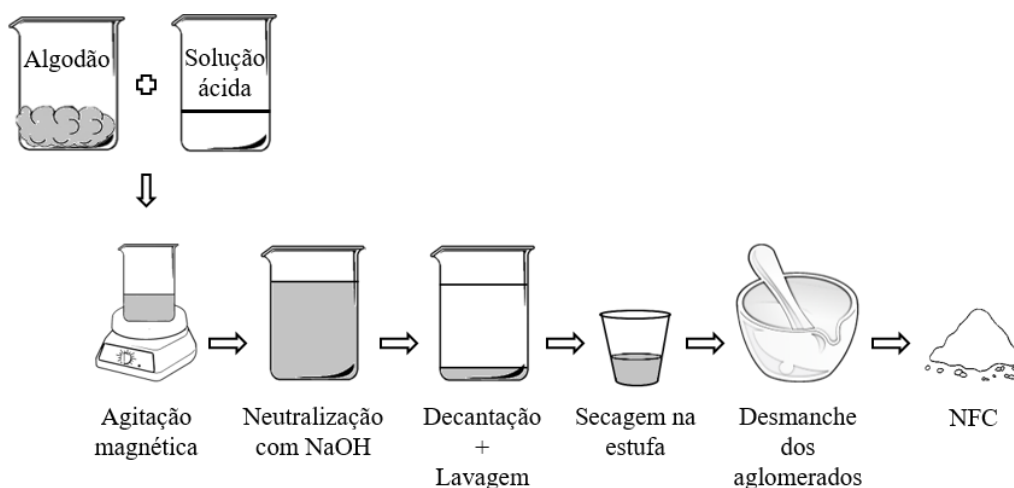


FONTE: MARINHO, 2016

4.2. Preparo das Nanofibras de Celulose (NFC)

Uma solução ácida foi preparada com concentração de 2,2 mol/L de HCl e 3,62 mol/L de H₂SO₄. A solução ácida, a 65 °C, foi vertida sobre a amostra de algodão comercial. A proporção utilizada foi 1g de algodão para cada 33,3 mL de solução. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 75 minutos à temperatura de 65 °C. A solução ácida com as NFC foi neutralizada com NaOH até se obter uma solução com pH 7,0. Após as NFC decantarem, o sobrenadante foi retirado e a amostra foi lavada quatro vezes com água destilada. Após a última retirada do sobrenadante, uma massa hidratada de NFC foi formada. Essa massa foi seca em estufa a 60 °C por 24 horas. Após secagem, foi utilizado um almofariz e pistilo para desmanchar as aglomerações de NFC formadas e assim obter a amostra em pó. As etapas de produção das NFC encontram-se representadas na figura 18.

Figura 18 - Produção das Nanofibras de Celulose



FONTE: da própria autora

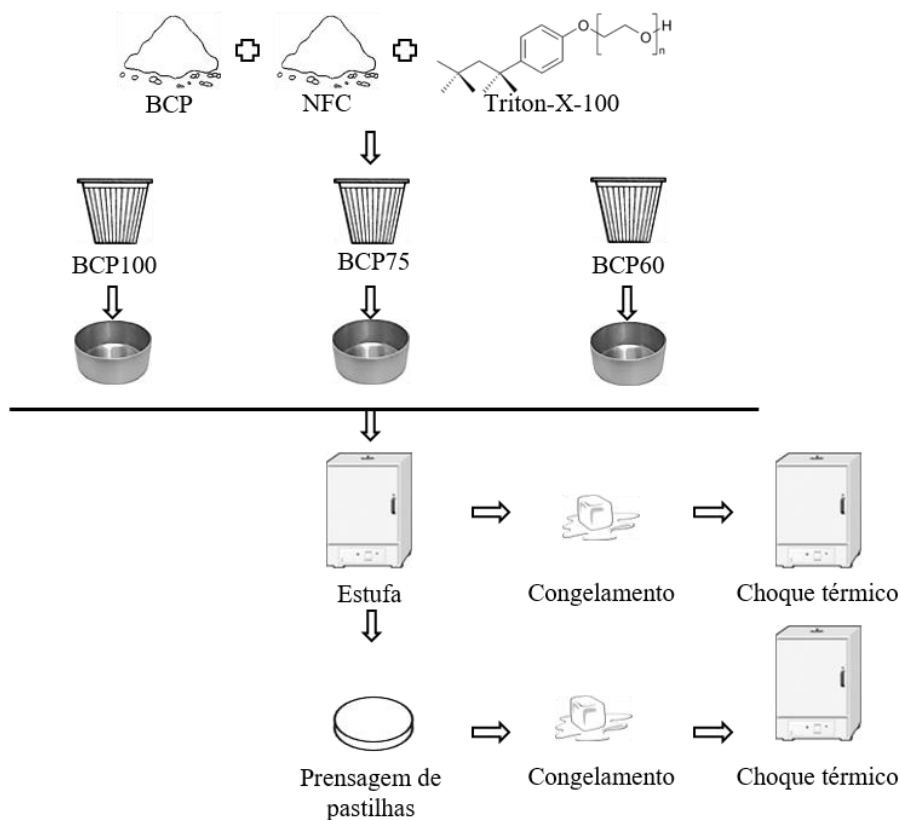
4.3. Preparo dos compósitos BCP-NCF

Três amostras foram preparadas com diferentes proporções de BCP, NFC e detergente TritonTM-X-100. Em proporção dos sólidos, as seguintes amostras foram produzidas: (i) amostra BCP100 – 4g de BCP e 0g de NFC; (ii) amostra BCP75 – 3g de BCP e 1g de NFC, perfazendo a proporção de 75:25; (iii) amostra BCP60 – 2,5g de BCP e 1,5g de NFC, perfazendo a proporção de 60:40. BCP100 é o controle que não contém fase polimérica,

BCP75 e BCP60 utilizam as proporções descritas a fim de mimetizar a composição óssea de fosfato de cálcio que é aproximadamente 65% (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

Todas as amostras foram hidratadas e individualmente agitadas vigorosamente por 5 minutos com 0,01% de Triton™-X-100 para formação de espuma. Posteriormente foram depositadas em recipiente de alumínio e levadas à estufa microprocessadora de cultura bacteriológica da marca Quimis, modelo Q316M4, por 60 min em temperatura de 60°C para a estabilização das bolhas formadas. Parte das amostras foi prensada a aproximadamente 15kPa e a tensão foi mantida constante por um minuto para a formação de pastilhas, congeladas em freezer da marca Consul, modelo CVU18, a -18 °C por 10 minutos e então submetidas a choque térmico em estufa de esterilização e secagem com microcirculação e renovação forçada de ar da marca CIENLAB, modelo CE-220/100, pré-aquecida a 168°C e mantidas nessa temperatura por 3 horas. A outra parte das amostras não passou pela prensagem, mas foram submetidas ao mesmo tratamento térmico das pastilhas. As etapas de produção dos compósitos BCP-NFC encontram-se representadas na figura 19.

Figura 19 - Produção dos compósitos BCP-NCF



4.4. Caracterização das Nanofibras de Celulose (NFC)

4.4.1. Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier - FTIR

Amostras de algodão comercial e NFC foram analisadas através da técnica de FTIR para identificação da composição química do material na faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro Nicolet Thermo Scientific 380 com cristal de seleneto de zinco (ZnSe) do Departamento de Química do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais.

4.4.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada no microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-20 - SuperTwin FEI – 200 kV, pertencente ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais. O equipamento operou a 200 kV com uma tensão variável de 60 kV, resolução de linha de 0,10 nm, resolução de ponto de 0,24 nm e aumento variável de 25 x a 1.100.000 x. As nanofibras foram diluídas em água e dispersas em um aparelho de ultrassom durante 10 minutos. Uma gota desta solução foi colocada sobre *grides* de carbono e deixadas para secar à temperatura ambiente por 24 horas. As amostras foram então coradas com solução contraste de 2 % de acetato de uranila. Após nova secagem à temperatura ambiente por 24 horas a morfologia e o diâmetro das nanofibras de celulose foram analisados no microscópio.

4.4.3. Difração de RaiosX - DRX

Amostras de algodão comercial e nanofibras de celulose (NFC) foram submetidas ao ensaio de DRX para avaliação da composição de fases e grau de cristalinidade. A amostra de algodão foi previamente prensada para obtenção de uma superfície mais homogênea. Já as NFC foram somente colocadas no suporte, pois se apresentavam como um pó. O equipamento utilizado foi o difratômetro de raiosX Shimadzu, modelo XRD-7000, operado com radiação de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,5418\text{\AA}$), tensão de 40 kV e corrente de 30 mA, pertencente ao Departamento de Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. O

ensaio foi feito a temperatura ambiente, o intervalo do ângulo de varredura utilizado foi de 10 a 80° (2θ) e passo de 0,02° a cada 40 s.

O índice de cristalinidade (I_c), das amostras foi calculado utilizando a equação a seguir:

$$I_c = (I_{\text{cristalino}} - I_{\text{amorfo}}) / I_{\text{cristalino}} \times 100 \quad (\text{equação 10})$$

Onde $I_{\text{cristalino}}$ corresponde a altura da fase cristalina ($2\theta \sim 22,6^\circ$) e I_{amorfo} corresponde a altura da fase amorfa ($2\theta \sim 18^\circ$) em relação à linha base.

4.5. Caracterização dos compósitos de BCP e NFC

4.5.1. Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier - FTIR

Após a fabricação dos compósitos, as amostras não prensadas BCP100, BCP75 e BCP60 foram analisadas no equipamento de FTIR para identificação da composição química. O equipamento utilizado e os parâmetros adotados foram os mesmos descritos para a análise das nanofibras de celulose, item 5.4.1.

4.5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

As micrografias dos compósitos não prensados foram feitas no microscópio Shimadzu, modelo SSX-550 do Departamento de Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. As amostras foram previamente metalizadas com ouro. Foram obtidos aumentos de 50x, 350x e 2000x para observação da morfologia dos materiais.

4.5.3. Ângulo de Contato

Medidas do ângulo de contato formado entre gotículas de água e os compósitos prensados BCP100, BCP75 e BCP60, foram realizadas no equipamento da marca Krüss, modelo DAS100 pertencente ao Departamento de Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. Foram utilizadas gotas de 30 μL com velocidade de descida de 10 μL por segundo. As imagens obtidas foram arquivadas, assim como o valor médio do ângulo de contato formado nas diferentes amostras.

4.5.4. Isotermas de Brunauer, Emmett e Teller (BET)

As amostras foram analisadas no equipamento da marca Nova, modelo 2200 do Departamento de Engenharia de Materiais do Centro de Educação Tecnológica de Minas Gerais. Os materiais BCP100, BCP75 e BCP60 foram tratados durante 12 horas sob vácuo na temperatura de 130 °C para retirada de possíveis impurezas. O ensaio foi realizado com nitrogênio gasoso e 30 pontos foram coletados para análise da área superficial e porosidade dos materiais.

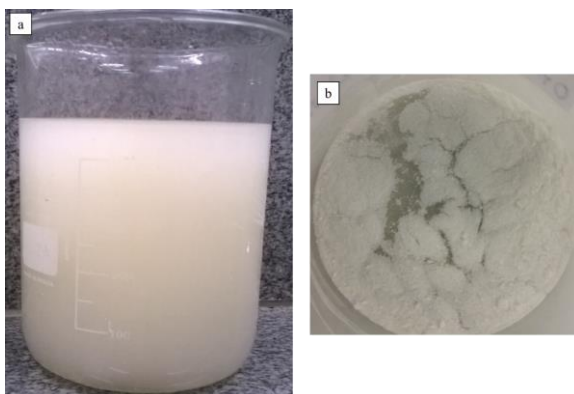
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção e Caracterização das Nanofibras de Celulose

As nanofibras de celulose produzidas por hidrólise ácida originaram uma suspensão estável com aspecto branco, leitoso e homogêneo (Figura 20a). Após a neutralização com hidróxido de sódio a massa de NFC hidratada foi sedimentada e o sobrenadante apresentou aspecto límpido. A parte decantada era pastosa e apresentava uma massa muito elevada, cerca de quatro vezes maior que a massa seca de algodão introduzida à mistura. Ao final do processo de secagem e cominuição, obteve-se um pó branco, fino e solto (Figura 20b). Tanto o aspecto da solução, quanto das NFC obtidas é semelhante a resultados previamente descritos na literatura (TEIXEIRA *et al.*, 2010; TAIPINA, 2012; MORAES *et al.*, 2016).

O rendimento de produção das NFC foi aproximadamente de 91,5%. Produzir nanofibras de celulose com elevado rendimento a partir de algodão comercial, um material abundante e barato, e utilizando técnicas simples de processamento é uma estratégia de pesquisa promissora, uma vez que NFC são amplamente utilizadas na literatura como reforço de matrizes poliméricas e cerâmicas para as mais distintas aplicações (WEI *et al.*, 2016; SVAGAN *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017). No presente trabalho as NFC foram utilizadas como reforço para uma matriz cerâmica de fosfato de cálcio com a possível aplicação no reparo de tecidos ósseos.

Figura 20 – Aspecto macroscópico das NCF

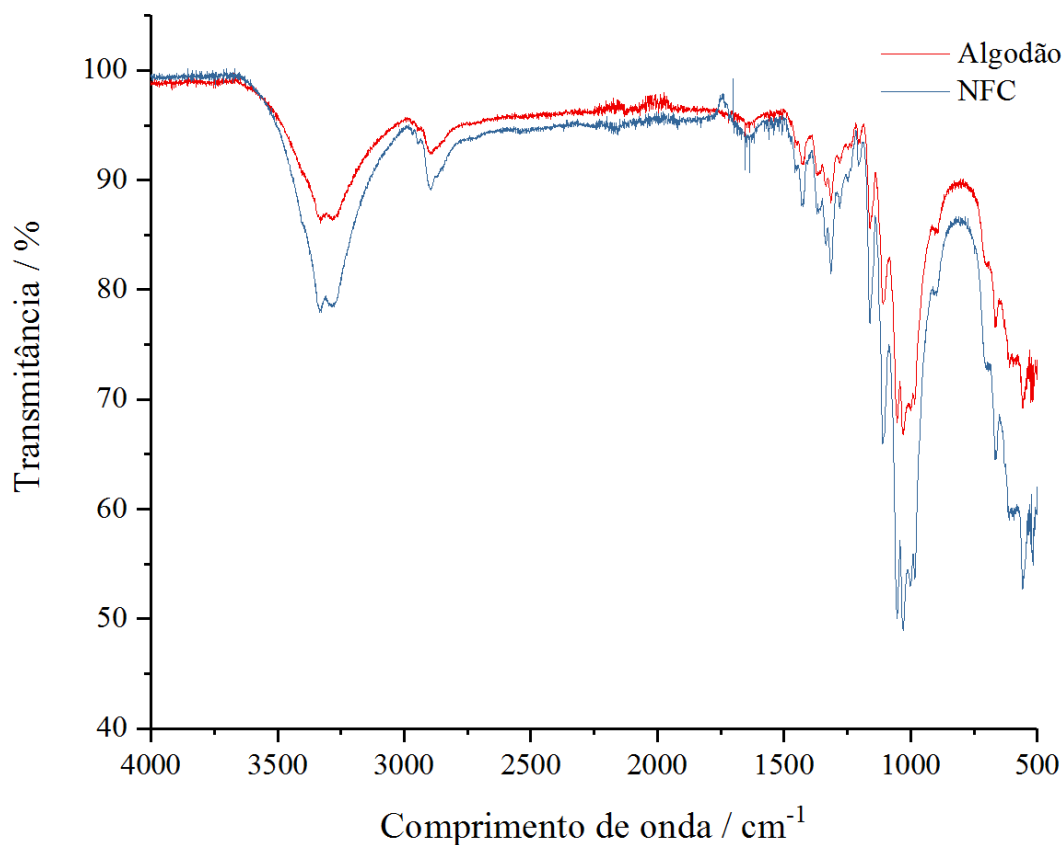


(a) Imagem da suspensão de NFC em solução ácida antes da neutralização com NaOH, e (b) Pó obtido no final do processo, após secagem e cominuição dos grumos formados.

Fonte: da própria autora

Amostras de algodão comercial e NFC foram submetidas ao ensaio de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para avaliar a composição química e a presença de contaminantes. Os espectros do algodão comercial e da NFC apresentam bandas típicas da celulose (TAIPINA, 2012; SÁ *et al.*, 2015, NASCIMENTO *et al.*, 2016). Na figura 21 observam-se picos em $3331,2\text{ cm}^{-1}$ e $3333,1\text{ cm}^{-1}$ característicos dos grupos hidroxila da celulose e da água de hidratação das fibras. Os picos a $2897,2\text{ cm}^{-1}$ e $2902,9\text{ cm}^{-1}$ são característicos da vibração de estiramento, vibração simétrica e assimétrica em CH alifáticos presentes. As bandas de $1632,8\text{ cm}^{-1}$ e $1640,5\text{ cm}^{-1}$ podem ser obtidas pela presença de água nas fibras ou reações de oxidação. As bandas em $1429,3\text{ cm}^{-1}$ e $1427,3\text{ cm}^{-1}$ caracterizam deformação angular de C-H. O pico no comprimento de onda $1314,5\text{ cm}^{-1}$ foi equivalente em ambas as amostras, e é formado devido a presença de vibrações entre grupos C-O, tal vibração ocorre em estiramentos nos anéis. Os picos coincidentes a $1030,0\text{ cm}^{-1}$ estão relacionados a estiramentos CO e OH na celulose. Por fim, os picos a $903,7\text{ cm}^{-1}$ e $907,5\text{ cm}^{-1}$ são formados devido a ligações β glicosídicas entre os monossacarídeos. Além dos picos descritos, na amostra de NFC observa-se um pico em $1730,0\text{ cm}^{-1}$ que não está presente na amostra de algodão comercial. Alguns trabalhos relatam que a oxidação da celulose pode gerar um pico nessa região (FAN *et al.*, 2012; LOJEWSK *et al.*, 2014) deste modo mais estudos são necessários para verificar essa possibilidade. Além disso, nas análises de FTIR não foram encontrados picos que indicassem a presença de contaminantes nas amostras.

Figura 21 – FTIR das amostras de algodão e NFC



	OH	C-H	H ₂ O (?)	CH ₂	C-O	CO e OH	Ligações β glicosídicas
Algodão (cm ⁻¹)	3331,2	2897,2	1632,8	1429,3	1314,5	1030,0	903,7
NFC (cm ⁻¹)	3333,1	2902,9	1640,5	1427,3	1314,5	1030,0	907,5
Deslocamentos (cm ⁻¹)	1,9	5,7	7,7	-2,0	0,0	0,0	3,8

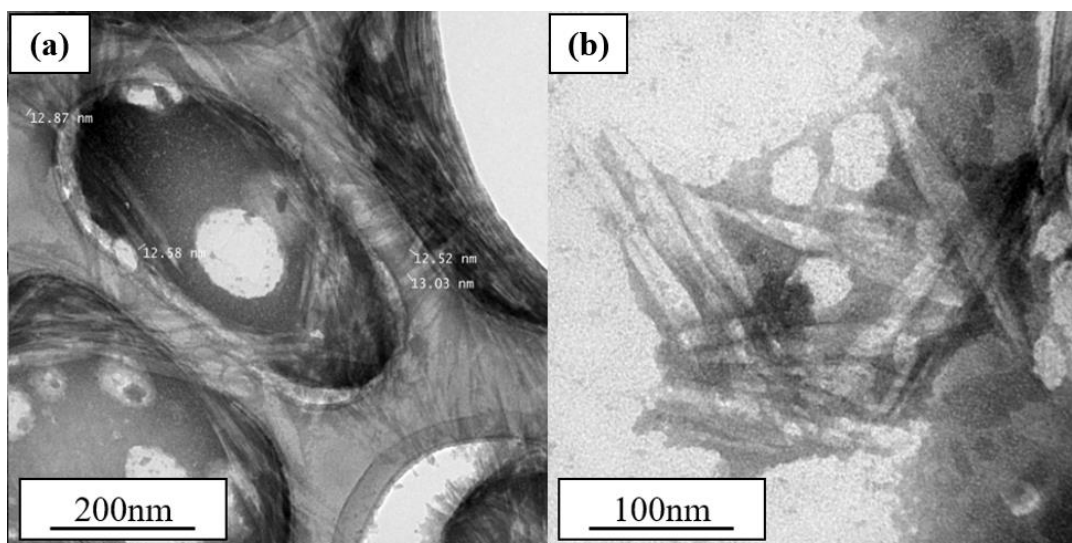
Fonte: da própria autora

A morfologia e o diâmetro das nanofibras de celulose obtidas por hidrólise ácida foram observados através da Microscopia Eletrônica de Transmissão (Figura 22). Na Figura 22a, as nanofibras encontram-se organizadas em feixes por cima da malha de carbono onde foram depositadas, mostrando um elevado grau de aglomeração entre as fibras. Durante o preparo da amostra as NFC foram dissolvidas em água e dispersadas em um ultrassom, entretanto as fibras continuaram aglomeradas. Essa característica das NFC foi extensivamente relatada na literatura (TEIXEIRA *et al.*, 2010; TAIPINA, 2012; VIANA, 2013), e deve-se à

interação entre os grupos hidroxilas das moléculas de glicose, unidades formadoras da celulose.

O diâmetro médio observado foi de 12,75 nm, medida compatível com a descrição de NFC obtidas em trabalhos anteriores (TEIXEIRA *et al.*, 2010; TAIPINA, 2012). Na Figura 22b, uma porção entre vazios na malha foi representada. A estrutura se encontra na escala nanométrica e em formato de agulha, confirmando a eficácia do tratamento ácido realizado.

Figura 22 - MET das NFC

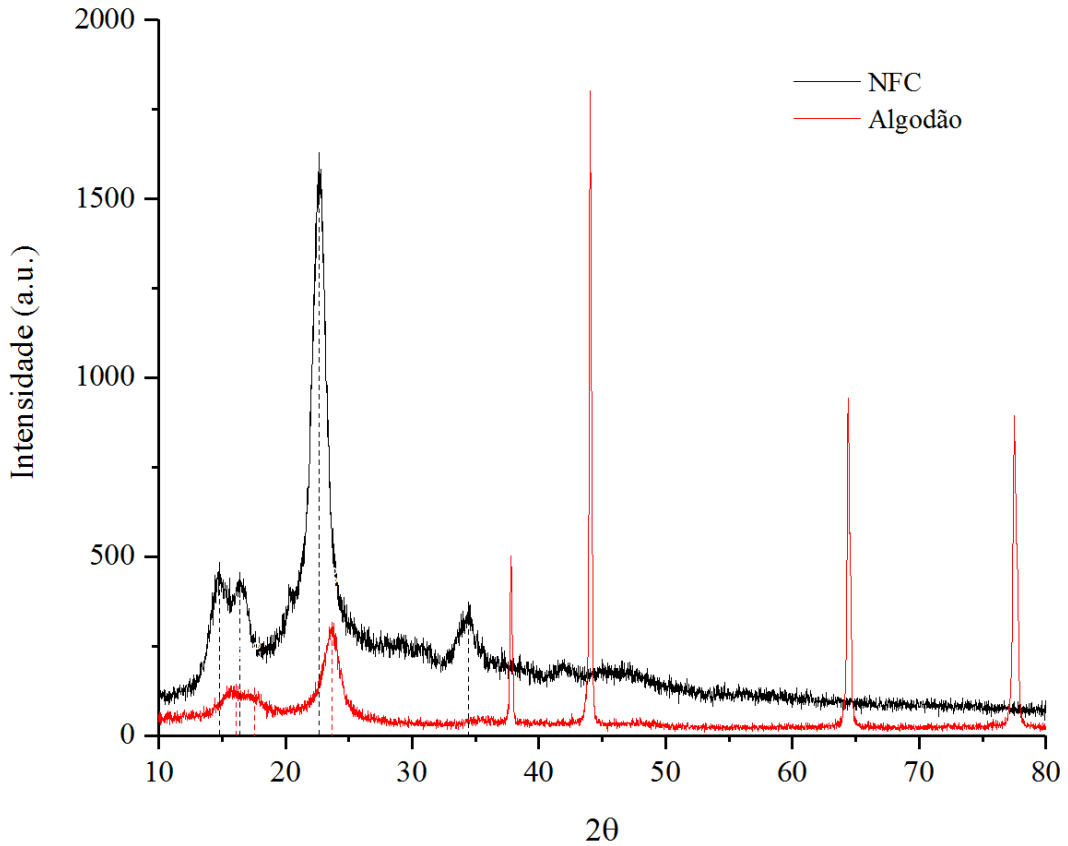


Fonte: da própria autora

A figura 23 mostra os difratogramas de raiosX das amostras de algodão comercial e NFC. Os picos em 2θ de aproximadamente 15° , 17° e 23° com direções cristalográficas (101), (10-1) e (002) respectivamente, indicam a presença de celulose tipo I presente tanto no algodão quanto nas NFC. Taipina (2012) acentua que o pico duplo ao redor de 15° é indicativo da presença de material celulósico, portanto, presente em ambas as amostras. O pico de $34,5^\circ$ referente ao plano cristalográfico (040) está presente somente na amostra NCF. Resultado semelhante já havia sido descrito em trabalhos anteriores (TEIXEIRA *et al.*, 2010; TAIPINA, 2012).

Na amostra de algodão observam-se quatro picos em $2\theta > 35^\circ$. Esses picos se devem à difração de raiosX do porta-amostra e não do seu conteúdo, algodão comercial, e, portanto, foram ignorados. Em análises posteriores do algodão esses picos não foram observados (resultados não mostrados).

Figura 23 - DRX das amostras de algodão e NFC



Fonte: da própria autora

Uma análise comparativa dos difratogramas mostra que a intensidade dos picos sofreu alteração, resultando em uma alteração da cristalinidade das fibras após a hidrólise ácida. A Tabela 5 sumariza os principais picos obtidos nas análises de DRX e o índice de cristalinidade calculado a partir da equação 10.

Tabela 5 - Intensidade dos picos obtidos no DRX e Índice de Cristalinidade.

Picos na NFC	Intensidade (a.u.)	Índice de cristalinidade
14,82°	267,99	80%
16,38°	225,43	
22,66°	1379,56	
34,44°	160,58	
Picos no Algodão	Intensidade (a.u.)	Índice de cristalinidade
16,1°	82,53	68%
17,6°	68,69	
23,68°	255,84	

Fonte: da própria autora

O aumento do índice de cristalinidade das NFC em relação ao algodão comercial indica a efetividade da hidrólise ácida que remove preferencialmente a fase amorfa da fibra. Índices de cristalinidade semelhantes foram encontrados no trabalho de Teixeira *et al.* (2010) e no trabalho de Taipina (2012).

5.2. Produção e Caracterização dos Compósitos de BCP e NFC

Compósitos com diferentes proporções de BCP e NFC foram obtidos através da técnica de produção de espumas, uma estratégia experimental utilizada para obter compostos porosos. Na figura 24 são mostradas imagens das partículas e pastilhas em diversos momentos do processo de síntese.

Após misturar as quantidades previamente determinadas de BCP, NFC, detergente TritonTM-X100 e água as amostras foram submetidas a agitação manual vigorosa. Tal procedimento resultou em muitas bolhas devido à presença do detergente. Essas bolhas, no entanto, não são estáveis à temperatura ambiente, e por isso, as amostras foram aquecidas a 60°C durante 60 minutos visando à estabilização das bolhas. As amostras após estabilização são vistas nos itens (a), (b) e (c) da Figura 24. Esse material, no entanto, é bastante frágil e, no intuito de aumentar a resistência mecânica, as partículas e as pastilhas foram submetidas a um choque térmico (Itens (d) a (f) e (j) a (l) respectivamente, da figura 24.

Figura 24 - Partículas e pastilhas de BCP100, BCP75 e BCP60



Espuma de (a) BCP100, (b) BCP75 e (c) BCP60 após estabilização da estrutura em estufa a 60°C por 60 minutos. Espuma de (d) BCP100, (e) BCP75 e (f) BCP60 após choque térmico. Pastilhas formadas de (g) BCP100, (h) BCP75 e (i) BCP60 a partir do material formado em (a), (b) e (c). Pastilhas de (j) BCP100, (k) BCP75 e (l) BCP60 após choque térmico.

Fonte: da própria autora.

Pela tonalidade das amostras, percebe-se que as partículas e as pastilhas com maior teor de NFC ficaram mais escuras ao final do tratamento térmico a 168 °C. Trabalhos encontrados na literatura descrevem uma faixa de temperatura entre 210 °C e 300 °C na qual as nanofibras de celulose iniciam sua degradação (CORREA, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2010). Deste modo, é pouco provável que a mudança de tonalidade seja uma consequência da degradação das NFC em virtude do tratamento térmico. As análises de FTIR das NFC (tópico 6.1 desta Seção) indicam a presença de uma banda em 1730,0 cm⁻¹ que alguns autores atribuem à formação de produtos de oxidação da celulose. A mudança de tonalidade observada nas nanofibras pode ser pelo menos em parte, associada a esse fator, uma vez que a estufa utilizada para o choque térmico das amostras possuía intensa circulação de ar. No entanto, mais estudos são necessários para se confirmar essa possibilidade.

Outra característica importante é a resistência das pastilhas formadas. A amostra BCP60 que possui maior teor de NFC absorveu maior quantidade de água e, portanto, o material não permaneceu dentro do molde ao ser prensado e quebrou. Após a prensagem, ao quebrar as pastilhas com as mãos, é possível perceber a seguinte relação de resistência das amostras: BCP100 > BCP75 > BCP60. Entretanto, ensaios mecânicos deverão ser realizados para avaliar quantitativamente as propriedades mecânicas dos materiais produzidos. Além disso, seria importante otimizar o protocolo de preparo das pastilhas para evitar que elas quebrem e facilitar a comparação entre elas.

A figura 25 apresenta o gráfico de FTIR comparativo entre as amostras BCP100, BCP75, BCP60 e NFC, explicitando a interação entre BCP e NFC nos compósitos.

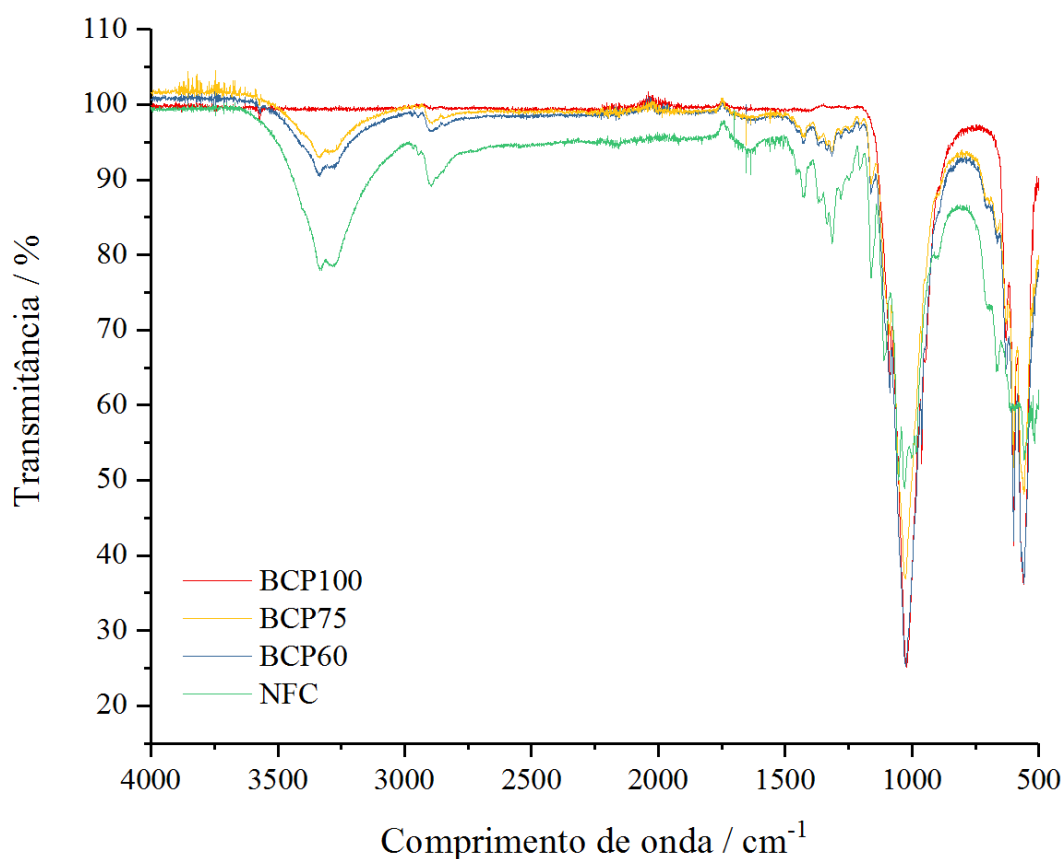
Para a amostra BCP100, ou seja, a amostra que contém somente BCP observam-se em 3574,3 cm⁻¹ e em 628,8 cm⁻¹ picos correspondentes à hidroxila. Já os picos em 1085,0 cm⁻¹, 1022,0 cm⁻¹, 962,5 cm⁻¹, 597,9 cm⁻¹ e 559,1 cm⁻¹ são indicativos da presença de PO₄³⁻ (KIM, 2012).

Para dois os compósitos produzidos percebe-se que a quantidade de NFC presente na amostra possui uma relação direta com a intensidade das bandas características das nanofibras. O quadro abaixo da figura 25 sumariza as bandas encontradas nas análises de FTIR das amostras, evidenciando que as bandas dos compósitos apresentam um pequeno desvio em relação àquelas das nanofibras. Infere-se, portanto, que houve interação entre os componentes do compósito. As duas últimas bandas identificadas, no entanto, não podem ser

atribuídas apenas a CO e OH e ligações β glicosídicas porque se sobrepõem às bandas do PO_4^{3-} presentes no BCP.

A presença de sais provenientes da neutralização da solução ácida não pôde ser confirmada nessa técnica porque o cloreto de sódio é transparente à radiação infravermelha, e o sulfato de sódio possui bandas de absorbância que se sobrepõem às dos outros compostos, a saber, $\sim 2900,0 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1110,0 \text{ cm}^{-1}$, $620\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$ (NIST, 2016).

Figura 25 - FTIR comparativo entre as amostras BCP100, NFC e os compósitos BCP75 e BCP60

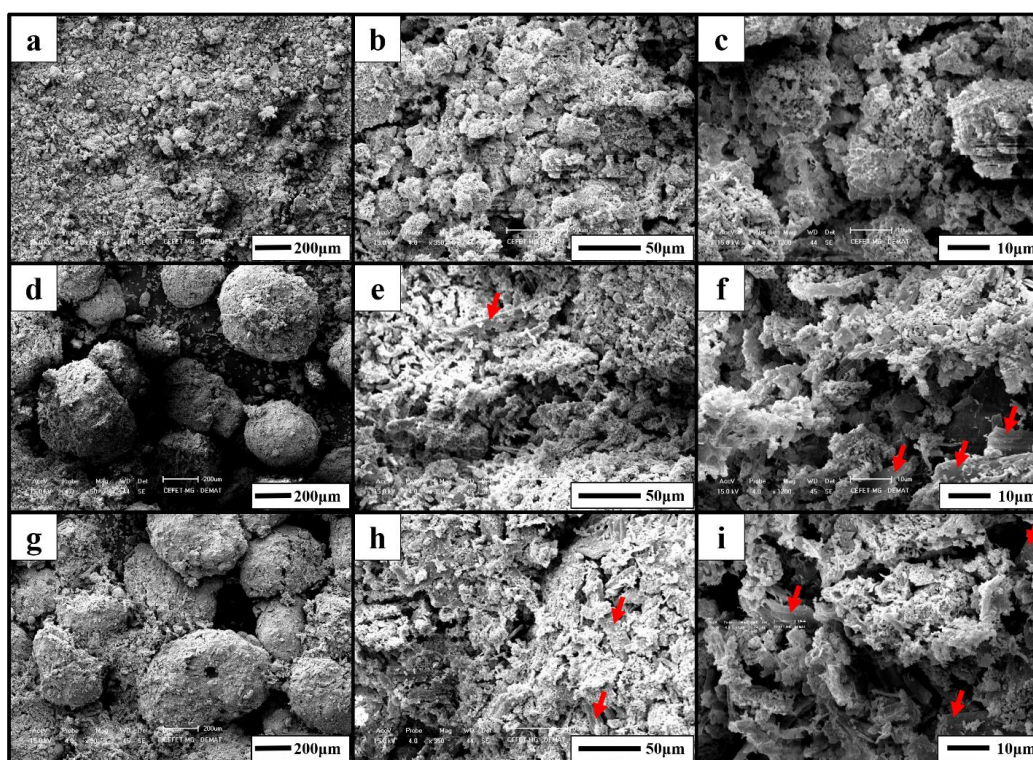


	PO_4^{3-}	PO_4^{3-}	OH	PO_4^{3-}	PO_4^{3-}	PO_4^{3-}	OH
BCP100	559,1	597,9	628,8	962,5	1022,0	1085,0	3574,3
	OH	C-H	H_2O (?)	CH_2	C-O	CO e OH (?)	Ligações β glicosídicas
NFC (cm^{-1})	3333,1	2902,9	1640,5	1427,3	1314,5	1030,0	907,5
BCP75 (cm^{-1})	3335,0	2893,0	1646,0	1419,6	1314,5	1026,1	559,0
BCP60 (cm^{-1})	3335,0	2909,0	1626,0	1426,4	1315,5	1024,0	557,0

Fonte: da própria autora

O aspecto morfológico das partículas produzidas foi analisado através de Microscopia Eletrônica de Varredura, conforme apresentado na Figura 26. A amostra de BCP100, ou seja, somente BCP, possui uma superfície irregular e não esférica. Já os compósitos produzidos, BCP75 e BCP60, apresentam partículas esféricas no aumento de 50x e com tamanho superior a 200 μm , figuras 26d e 26g. A superfície dos compósitos produzidos apresenta-se bastante irregular e estruturas que consideramos semelhantes a cristais de sal podem ser observadas (setas vermelhas); entretanto, o método de neutralização da amostra com hidróxido não é amplamente relatado na bibliografia e não encontramos estruturas comprovadamente de sais em outros trabalhos. A contaminação com sais NaCl e Na₂SO₄ provenientes da neutralização da solução ácida é possível devido à natureza dos materiais utilizados, mas não foi comprovada nas análises de FTIR, e pode ser eliminada com lavagens sucessivas da amostra para a retirada da solução ácida ao invés da neutralização com hidróxido de sódio. Além disso, no aumento de 1200x pode-se observar a presença de poros, que apesar de não terem sido medidos, estão na escala micrométrica.

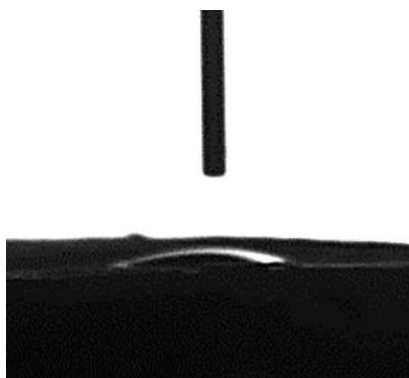
Figura 26 - MEV da amostra BCP100 e dos compósitos BCP75 e BCP60



As amostras (a), (b) e (c) são partículas de BCP100 mostradas com aumento de 50x, 350x e 1200x, respectivamente. As amostras (d), (e) e (f) são partículas de BCP75 mostradas com aumento de 50x, 350x e 1200x, respectivamente. As amostras (g), (h) e (i) são partículas de BCP60 mostradas com aumento de 50x, 350x e 1200x, respectivamente. Fonte: da própria autora

Para a realização do ensaio de molhabilidade os materiais produzidos foram prensados. A pastilha de BCP100 apresentou um caráter hiperhidrofílico com desaparecimento da gota, mas mesmo assim foi possível capturar a imagem assim que a mesma tocou a superfície da amostra (Figura 27). As pastilhas de BCP75 e BCP60 também apresentaram caráter hiperhidrofílico, porém não foi possível sequer capturar a imagem da dispersão da água sobre a sua superfície. Esses dados de molhabilidade obtidos sugerem que a adição de nanofibras de celulose ao BCP aumenta a hidrofiliicidade das amostras. Como os todos os materiais produzidos eram hiperhidrofílicos não foi possível determinar com confiabilidade o ângulo médio de contato, deste modo foi realizada somente uma avaliação visual.

Figura 27 - Ângulo de contato da pastilha BCP100



Fonte: da própria autora

A análise da área superficial das partículas foi feita através da obtenção das isotermas de Brunauer, Emmett e Teller (BET). Os resultados obtidos para as amostras BCP100, BCP75 e BCP60 foram: 1,553 m²/g, 2,451 m²/g e 0,196 m²/g, respectivamente. Comparando-se a área superficial da amostra BCP100 e BCP60 observa-se um aumento de 158%, e da amostra BCP100 e BCP75 uma diminuição de 87% na área superficial. Como era esperado, a adição de 25% de NFC, material com elevada área superficial, a uma matriz cerâmica ocasionaria um aumento na área superficial, entretanto ao se adicionar 40% de NFC observa-se um efeito contrário. Esse resultado pode ser explicado pelo elevado grau de aglomeração das nanofibras, fato que é corroborado pelo menor tamanho das partículas de BCP60 comparado às partículas de BCP75.

O cálculo da porosidade através das isotermas do BET foi inconclusivo devido à área superficial das amostras, e consequentes erros associados à obtenção das curvas. Entretanto, em uma análise preliminar, conforme discutido no tópico de Microscopia Eletrônica de Varredura, os compósitos produzidos possuem poros na faixa de 10 μm aleatoriamente distribuídos.

Diversos autores relatam que não há formação óssea em poros inferiores a 50 μm e que as faixas ideais para osteocondução são de 50 a 300 μm . Entretanto, Dalapicula e Conz (2008) ressaltam que mesmo porosidades inferiores a estas são importantes porque levam a um aumento na área superficial e consequente atividade osteoreparadora. Além disso, as áreas superficiais dos compósitos produzidos estão dentro da faixa de materiais amplamente utilizados como enxerto ósseo: enxerto ósseo composto bovino microgranular, enxerto ósseo humano cortical liofilizado desmineralizado e enxerto ósseo composto bovino microgranular; com áreas superficiais iguais a 0,18 m^2/g , 0,89 m^2/g e 2,45 m^2/g , respectivamente (DALAPICULA e CONZ, 2008). Tais amostras possuíam também granulometria dentro da faixa de 125 a 600 μm , também compatível com a granulometria analisada qualitativamente nos dois compósitos de BCP e NFC.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho nanofibras de celulose (NFC) foram obtidas a partir da hidrólise ácida do algodão comercial, um material abundante e barato. Essa rota de síntese mostrou-se viável, uma vez que a partir de procedimentos laboratoriais simples produziu NFC com características físicas, cristalinidade e rendimento semelhantes aos descritos na literatura.

A produção de NFC apresentou um rendimento superior a 90%. As NFC apresentaram diâmetro médio de 12,75 μm e intenso grau de aglomeração. O grau de cristalinidade foi de 80,57%, aproximadamente 16% maior do que o índice de cristalinidade do algodão comercial, evidenciando assim a eficiência da hidrólise.

Pastilhas e partículas com diferentes concentrações de BCP e NFC foram obtidas através da técnica de produção de espumas e posteriormente foram caracterizadas. Compósitos foram produzidos, uma vez que as amostras BCP60 e BCP75 apresentaram bandas no espectro de infravermelho correspondentes às bandas de NFC e BCP. Além disso, as partículas apresentaram interação entre as fases constituintes uma vez que houve deslocamento das bandas de absorvância nos espectros de infravermelho. As análises de FTIR não indicaram a presença de contaminantes nos materiais produzidos.

As pastilhas de BCP e dos materiais compósitos mostraram elevada hidrofiliabilidade, característica muito importante para a aplicação intracorpórea de biomateriais. Adicionalmente, percebe-se que a adição de reforço polimérico aumentou a hidrofiliabilidade da matriz cerâmica e que o choque térmico alterou, ao menos qualitativamente, a resistência mecânica dos compósitos. A adição de 25% de NFC à matriz de BCP ocasionou um aumento de 158% na área superficial, entretanto concentrações maiores de NFC induzem redução na área superficial do compósito. Provavelmente essa redução se deve ao alto grau de aglomeração das NFC que se refletiu também no tamanho das partículas. Análises qualitativas da microscopia eletrônica de varredura indicam que os compósitos produzidos apresentam poros na ordem de 10 μm . Conclui-se, portanto, que os compósitos de NFC e BCP produzidos apresentam potencial para serem utilizados no reparo de lesões do tecido ósseo e que estudos posteriores são necessários para a completa caracterização físico-química e biológica desses materiais.

7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Como perspectivas futuras para este trabalho podemos citar:

- Realizar Difractometria de RaioX nos compósitos;
- Realizar análises térmicas das nanofibras de celulose produzidas – Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Termogravimétrica (TGA);
- Otimizar a produção das pastilhas de BCP e compósitos;
- Realizar ensaios mecânicos de compressão nos compósitos produzidos;
- Calcular a porosidade dos compósitos através do Método de Arquimedes;
- Definir quantitativamente o tamanho das partículas dos compósitos através de análise da distribuição granulométrica;
- Realizar ensaios *in vitro* para avaliar a biocompatibilidade dos materiais produzidos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERS, A. P. F. *et al.* Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raiosX. **Cerâmica**, São Paulo, v. 48, n. 305, p.34-37, mar. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-69132002000100008>.

Acesso em 29 out. 2016.

ALBERTS, Bruce *et al.* Tecidos Especializados, Células-tronco e Renovação de Tecidos. In: ALBERTS, Bruce *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. Cap. 23. p. 1417-1484.

AMORIM, Cintia Lugnani Gomes de. **Estudo do efeito das interações água-argila no inchamento de argilominerais através da difração de raiosX**. 2007. 128 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Nuclear, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <http://www.con.ufrj.br/DScTeses/Cintia/Tese_CintiaAmorim.pdf>. Acesso em 29 out. 2016.

AUERBACH, Robert. *et al.* Angiogenesis Assay: A Critical Overview. **Clinical Chemistry**. Madison, v. 49, n. 1, p. 32-40. Jan. 2003. Disponível em: < <http://www.clinchem.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=12507958>> . Acesso em: 15 jun. 2015.

BARBARISI, Manlio *et al.* Use of polycaprolactone (PCL) as scaffolds for the regeneration of nerve tissue. **Journal Of Biomedical Materials Research**. Naples, v. 103, n. 5, p. 1755-1760. 14 Sept. 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/enhanced/doi/10.1002/jbm.a.35318/>>. Acesso em: 25 mar. 2015.

BELO HORIZONTE. SISMOB (BHTRANS). **Taxa de vítimas não fatais em acidentes de trânsito (por 100 mil habitantes)**. 2014. Disponível em: <<http://www.bhtrans.pbh.gov.br/portal/page/portal/portalpublico/Temas/ObservatorioMobilidade/Indicadores/Trânsito e Seguranca/Índice de vítimas não fatais em acidentes de trânsito po>>. Acesso em: 06 out. 2016.

BOSE, Susmita; ROY, Mangal; BANDYOPADHYAY, Amit. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. **Trends In Biotechnology**, Pallman, v. 30, n. 10, p.546-554, Oct. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779912001151>>. Acesso em: 25 fev. 2015.

BRASIL. PREVIDÊNCIA SOCIAL. **Congresso III: IBGE anuncia aumento da longevidade e diminuição na fecundidade**. 2013. Disponível em: <<http://www.previdencia.gov.br/noticias/congresso-iii-ibge-anuncia-aumento-na-longevidade-e-diminuicao-na-fecundidade/>>. Acesso em: 28 abr. 2015.

CELULOSE MICROCRISTALINA: comprimidos. São Paulo: DEG, 2007. Bula de remédio. Disponível em: < http://cdn.fagron.com.br/doc_prod/docs_4/doc_344.pdf>. Acesso em; 15 jun. 2015.

CILAS. **Particle Size & Shape Analyzers**. 2010. 8 p. Disponível em: <https://www.cilas.com/sites/default/files/public/media/panes/cilas_brochure_granu_2010.pdf>. Acesso em: 29 out. 2016.

CORRÊA, Ana Carolina, 10., 2009, Foz do Iguaçu. **NANOFIBRAS DE CELULOSE A PARTIR DE FIBRAS DE CURAUÁ**. Foz do Iguaçu: -, 2010. 9 p. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/86121/1/proci-09.00086.PDF>>. Acesso em: 05 dez. 2016.

DALAPICULA, Sabrina S.; CONZ, Márcio B. **Caracterização físico-química de biomateriais para enxerto ósseo de origem alógena e xenógena**. *Implantnews*. v. 2, p. 205-213. Fev. 2008. Disponível em: <<http://www.osseocon.com.br/images/7.pdf>>. Acesso em: 09 dez. 2016.

DHANDAYUTHAPANI, Brahatheeswaran *et al.* Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. **International Journal Of Polymer Science**. Kawagoe Saitama, v. 2011, p. 1-19. July. 2011. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijps/2011/290602/>>. Acesso em: 20 maio 2015.

DRELICH, Jaroslaw. Guidelines to measurements of reproducible contact angles using a sessile-drop technique. **Surface Innovations**, [s.l.], v. 1, n. 4, p.248-254, dez. 2013. Thomas Telford Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1680/si.13.00010>. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/255483361_Guidelines_to_measurements_of_reproducible_contact_angles_using_a_sessile-drop_technique>. Acesso em: 30 out. 2016.

ERGUN, Calaletdin. *et al.* Synthesis and microstructural characterization of nano-size calcium phosphates with different stoichiometry. **Ceramics International**. [S.I.], v. 37, n. 3, p. 971-977. Apr. 2011. Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884210004608>>. Acesso em: 16 jun. 2015.

FAN, Jin-shi; LI, Yan-hao. Maximizing the yield of nanocrystalline cellulose from cotton pulp fiber. **Carbohydrate Polymers**, Shandong, v. 88, n. 4, p.1184-1188, May. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712001014>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

FAN, Mizi *et al.* Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Natural Fibres. In: SALIH, Salih. **Fourier Transform: Materials Analysis**. Rijeka: Intech, 2012. p. 45-68.

GUASTALDI, Antonio Carlos; APARECIDA, Anahi Herrera. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**. Araraquara, v. 33, n. 6, p. 1352-1358. mai. 2010. Disponível em: < http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol33No6_1352_24-RV09554.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2015.

GUILHERME, P. D. B. *et al.* Análise granulométrica de sedimentos de praias arenosas através de imagens digitais. Descrição de um protocolo de mensuração de partículas no software imagej - fiji. **Brazilian Journal Of Aquatic Science And Technology - Bjust**, Curitiba, v. 2, n. 19, p.23-32, jan. 2015. Disponível em: <<http://siaiap32.univali.br/seer/index.php/bjust/article/view/6874/5025>>. Acesso em: 29 out. 2016.

GUIMARÃES, Karis Barbosa. *et al.* Histomorphometric evaluation of calcium phosphate bone grafts on bone repair. **Braz J Otorhinolaryngol**. São Paulo, v. 77, n. 4, p. 447-454. July/Aug. 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S1808-86942011000400007&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 10 jun. 2015.

GUTIERRES, Manuel *et al.* Substitutos Ósseos: Conceitos Gerais e Estado Actual. **Arqui Med**. Porto, p. 153-162. jul. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.mec.pt/pdf/am/v19n4/v19n4a04.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

HOLY, Chantal E. *et al.* Bone Regeneration. In: LANZA, Robert; LANGER, Robert; VACANTI, Joseph. **Principles of Tissue Engineering**. 3. ed. Atlanta: Elsevier, 2007. Cap. 56. p. 845-860.

JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. Tecido Ósseo. In: JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap. 8. p. 135-152.

KEIL, Christiane Kunert. *et al.* Comparative study of biphasic calcium phosphate with beta-tricalcium phosphate in rat cranial defects – A molecular-biological and histological study. **Annals of Anatomy**. Dresden, v. 199, p. 79-84. May. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0940960213001684>>. Acesso em: 15 jun. 2015.

KIM, Tae-wan *et al.* In situ synthesis of magnesium-substituted biphasic calciumphosphate and in vitro biodegradation. **Materials Research Bulletin**, -, v. 9, n. 47, p.2506-2512, maio 2012.

LENG, Yang. **Materials Characterization: Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods**. Hong Kong: John Wiley & Sons, 2009. 384 p.

LI, Shujun. *et al.* Fabrication of nano-crystalline cellulose with phosphoric acid and its full application in a modified polyurethane foam. **Polymer Degradation and Stability**. Harbin, v. 98, n. 9, p. 1940-1944. Sept. 2013. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391013001882>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

LOJEWSKA, J. *et al.* Cellulose oxidative and hydrolytic degradation: In situ FTIR approach. **Polymer Degradation And Stability**, Krakow, v. 88, n. -, p.512-520, dez. 2004. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.566.7368&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 06 dez. 2016.

MACHADO, Jéferson Luis de Moraes. **Desenvolvimento de Cimento Ósseo de Fosfato de Cálcio Como Suporte Para o Crescimento de Tecidos**. 2007. 118 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia, Minas, Metalúrgica e Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MARCHI, Juliana. Cell Response of Calcium Phosphate Based Ceramics, a Bone Substitute Material. **Materials Research**. Santo André, v. 16, n. 4, p. 703-712. Apr. 2013. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S1516-14392013000400003&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: <15 jun. 2015.

MARINHO, Jéssica Pauline Nunes *et al.* **Caracterização de nanocompósitos de celulose e BCP para aplicação em engenharia de tecido ósseo**. In: COLAOB, 9., 2016, Foz do Iguaçu. Foz do Iguaçu, 2016. p. 1 - 1.

MILANEZ, D. H. *et al.* 21., 2014, Cuiabá. **Prospecção Tecnológica Sobre Nanocelulose Aplicada a Materiais Compósitos**. Cuiabá: -, 2014. 8 p. Disponível em: <http://www.nit.ufscar.br/refbase/PATH_TO_FILES_BASE_DIRECTORY/milanez/2014/26_MILANEZ_et al2014.pdf>. Acesso em: 06 out. 2016.

MORAES, Ariana de Souza *et al.* Caracterização morfológica de nanocristais de celulose por microscopia de força atômica: Morphological characterization os cellulose nanocrystals by atomic force microscopy. **Revista Matéria**, Sorocaba, v. 21, n. 2, p.532-540, jan. 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rmat/v21n2/1517-7076-rmat-21-02-00532.pdf>>. Acesso em: 06 out. 2016.

MOHOMED, Kadine. **Thermogravimetric Analysis (TGA)**: New Castle: Waters, 2016. 235 slides, color. Disponível em: <<http://www.tainstruments.com/wp-content/uploads/CA-2016-TGA.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2016.

NASCIMENTO, Pedro *et al.* Nanocellulose Produced from Rice Hulls and its Effect on the Properties of Biodegradable Starch Films. **Mat. Res.**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.167-174, fev. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1980-5373-mr-2015-0423>. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mr/v19n1/1516-1439-mr-1980-5373-MR-2015-0423.pdf>>. Acesso em: 06 out. 2016.

NIST (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY). **Sodium sulfate**. 2016. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=B6000542&Mask=80#IR-Spec>>. Acesso em: 06 dez. 2016.

OGEDA, Thais Lucy. **Disciplina PAE: QFL2453 Físico-Química Experimental**. São Paulo: Usp, 2010. 6 p. Disponível em: <http://www2.iq.usp.br/pos-graduacao/images/documentos_pae/1sem2010/fisico_quimica/thais.pdf>. Acesso em: 31 out. 2016.

OLIVEIRA, Marcio Roberto S. Superfícies super-hidrofóbicas obtidas através de microestruturas litografadas. 2011, 125f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

OVALLE, William; NAHIRNEY, Patrick C. Tecido cartilaginoso e tecido ósseo. In: OVALLE, William; NAHIRNEY, Patrick C. **Netter Bases da Histologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. cap. 6. p. 131-156.

PARREIRA, Ricardo Cambraia; RESENDE, Rodrigo R. Células-Tronco Mesenquimais, o que são e de Onde Vêm? **Nanocell News**. [S.I.], p. 1-2. 30 out. 2013. Disponível em: <<http://www.institutonocell.org.br/celulas-tronco-mesenquimais-o-que-sao-e-de-onde-vem/#>>. Acesso em: 22 jun. 2015.

PETERSON, Larry J. *et al.* Reparação das Fediras. In: PETERSON, Larry J. *et al.* **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. cap. 4. p. 55-62.

PICARD, Fatima N. Syed. *et al.* Osteoinductivity of calcium phosphate mediated by connexin 43. **Biomaterials**. Pittsburg, v. 34, n. 15, p. 3763-3774. May. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961213001506>>. Acesso em: 16 jun. 2015.

PINHEIRO, Marcelo de Medeiros. Epidemiologia da Osteoporose no Brasil. In: HOSPITAL ALEMÃO OSWALDO CRUZ. **Como eu Trato**. [S.I.:s.n.], 2011. p.6-17. Disponível em: <http://www.hospitalalemao.org.br/medicos/Pdf/Comoeutrato_Parte2.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2015.

SÁ, Renato Mariano de; MIRANDA, Cleidiane Souza de; JOSÉ, Nadia Mamede. Preparation and Characterization of Nanowhiskers Cellulose from Fiber Arrowroot (*Maranta arundinacea*). **Mat. Res.**, [s.l.], v. 18, p.225-229, dez. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1516-1439.366214>. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mr/v18s2/1516-1439-mr-18-S02-225.pdf>>. Acesso em: 06 out. 2016.

SEO, Seog-jin *et al.* Strategies for osteochondral repair: Focus on scaffolds. **Journal Of Tissue Engineering**, Cheonan, v. 5, p.1-14, July. 2014. Disponível em: <<http://tej.sagepub.com/content/5/2041731414541850.full.pdf+html>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

SING, Kenneth S. W. *et al.* Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems. **Handbook Of Heterogeneous Catalysis**, [s.l.], v. 57, n. 4, p.603-619, 15 mar. 2008.

TAIPINA, Márcia de Oliveira. **Nanocristais de celulose: obtenção, caracterização e modificação de superfície**. 2012. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012. Disponível em: <<http://www.biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/000863645.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

STEIN, Rodrigo Steffen. **Estudo Comparativo Da Neoformação Óssea Utilizando-Se O Enxerto Autógeno E Três Substitutos - Defeitos Ósseos Em Ratos**. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SVAGAN, Anna J. *et al.* Solid cellulose nanofiber based foams – Towards facile design of sustained drug delivery systems. **Journal Of Controlled Release.** -, p. 74-82. 28 dez. 2016. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0168365916307696/1-s2.0-S0168365916307696-main.pdf?_tid=57aee30e-bbaf-11e6-960d-00000aab0f27&acdnat=1481027425_d56a6bc91e8bcbc2476a91d0ebf6f675>. Acesso em: 06 dez. 2016.

TEIXEIRA, Eliangela de M. *et al.* Nanofibras de algodão obtidas sob diferentes condições de hidrólise ácida. **Polímeros**, São Carlos, v. 20, n. 4, p.264-268, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/readcube/epdf.php?doi=10.1590/S0104-14282010005000046&pid=S0104-14282010000400006&pdf_path=po/v20n4/AOP_0526.pdf&lang=pt>. Acesso em: 10 jun. 2015.

TORTORA, Gerard J.; DERRICKSO, Bryan. O Sistema Esquelético. In: TORTORA, Gerard J.; DERRICKSO, Bryan. **Corpo Humano: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia.** 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. Cap. 6. p. 118-163.

VIANA, Livia Cássia. **Desenvolvimento de filmes celulósicos nanoestruturados a partir da polpa kraft de Pinus sp.** 2013. 125 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Florestal, Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/bitstream/handle/1884/33842/R-T-LIVIA-CASSIA-VIANA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 15 jun. 2015.

WANG, Yalong. Multifunctional hybrid films prepared by aqueous stabilization of graphene sheets viaing cellulose nanofibers and exfoliated montmorillonite system. **European Polymer Journal.** Beijin, p. 85-93. out. 2016. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0014305716304451/1-s2.0-S0014305716304451-main.pdf?_tid=1682990c-bbaf-11e6-9622-00000aacb360&acdnat=1481027315_0b1d8e9ddf460fbef2ed1d3529fb9309>. Acesso em: 06 dez. 2016.

WEI, Jinguang *et al.* Effect of surface charge content in the TEMPO-oxidized cellulose nanofibers on morphologies and properties of poly(N -isopropylacrylamide)-based composite hydrogels. **Industrial Crops And Products.** Hangzhou, p. 227-235. 11 ago. 2016. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0926669016305076/1-s2.0-S0926669016305076-main.pdf?_tid=82ee82c4-bba3-11e6-bed0-00000aacb362&acdnat=1481022343_d766b5fd7036cea831cf87be916ee83c>. Acesso em: 06 dez. 2016.

WILLIAMS, Jessica M. *et al.* Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. **Biomaterials**, Michigan, v. 26, n. 23, p. 4817-4827. Jan. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961204011068>>. Acesso em: 25 mar. 2015.