



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Tecnologia e Ciências
Instituto Politécnico

Daniella Herdi Cariello

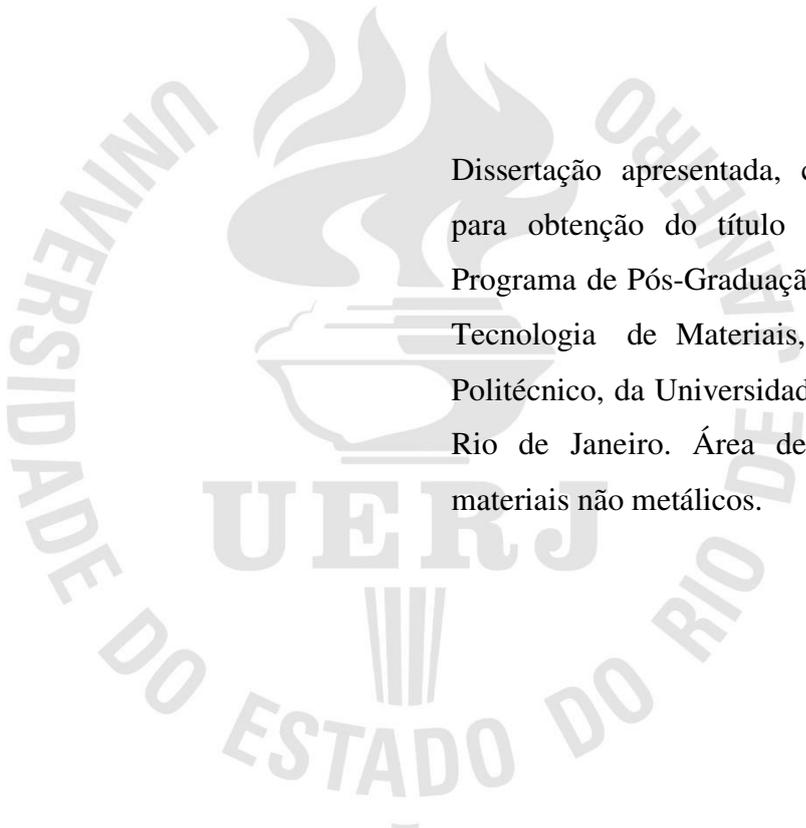
Síntese de membranas híbridas para aplicação como biomaterial

Nova Friburgo

2024

Daniella Herdi Cariello

Síntese de membranas híbridas para aplicação como biomaterial



Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, do Instituto Politécnico, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: materiais não metálicos.

Orientadoras: Dra. Mônica Calixto de Andrade

Dra. Kelly Cristine da Silveira

Nova Friburgo

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/E

C277 Cariello, Daniella Herdi.
Síntese de membranas híbridas para aplicação como biomaterial /
Daniella Herdi Cariello. - 2024.
61 f. : il.

Orientadora: Mônica Calixto de Andrade.
Coorientadora: Kelly Cristine da Silveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Instituto Politécnico.

1. Materiais biomédicos – Teses. 2. Membranas (Tecnologia)
– Teses. 3. Acetato de celulose – Teses. I. Andrade, Mônica Calixto
de. II. Silveira, Kelly Cristine da. III. Universidade do Estado do Rio
de Janeiro. Instituto Politécnico. IV. Título.

CDU 66.09:61

Bibliotecária Fernanda Souza Cruz CRB7/7361

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação,
desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Daniella Herdi Cariello

Síntese de membranas híbridas para aplicação como biomaterial

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, do Instituto Politécnico, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: materiais não metálicos.

Aprovada em 17 de junho de 2024.

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Mônica Calixto de Andrade (Orientadora)
Instituto Politécnico – IPRJ/UERJ

Prof^a. Dra. Kelly Cristine da Silveira (Orientadora)
Instituto Politécnico – IPRJ/UERJ

Prof^a. Dra. Shirleny Fontes Santos
Campus Zona Oeste - UERJ/ZO

Prof^a. Dra. Laísa Araújo Cortines Laxe
Departamento de Odontologia Restauradora - ORE/UFJF

Prof^a. Dra. Letícia dos Santos Aguilera
Instituto Politécnico - IPRJ/UERJ

Nova Friburgo

2024

Ao maior amor do mundo, Jade.

AGRADECIMENTOS

É impossível traduzir em palavras a experiência vivida durante os últimos anos. O mestrado me abriu caminhos e permitiu encontros com pessoas e sentimentos que enriqueceram enormemente minha trajetória. Chegou a hora de expressar minha gratidão a todos aqueles que se dedicaram à realização desta pesquisa.

Foi durante essa pesquisa que Jade chegou para revolucionar. Me transformou e me apresentou uma força até então desconhecida. Obrigada, minha filha, por dar sentido à minha existência e, além disso, por dividir noites em claro comigo desde a barriga.

Rodrigo, meu parceiro de vida, foi o responsável pelo meu ingresso no mestrado. Serei eternamente grata pelo incentivo desmedido.

À minha mãe, Arilza, dona da alma mais bondosa que já habitou nessa Terra, pelo suporte e afago de um jeito que só mãe é capaz.

Ao meu pai, Daniel, por acreditar mais em mim do que eu mesma.

Aos meus irmãos, Gabriella e Erick, por serem o meu braço direito. É por eles que acredito e trabalho para construção de um mundo melhor.

À tia Ana, por ser, como costume dizer, um anjo na minha vida.

À minha avó Lucia, que é a personificação do amor divino. Aos meus avós, Ozório e Clementina, pelos olhares de admiração que tanto me fortaleceram. Ao meu avô Francisco, *in memoriam*.

Ao Tio Juninho, por existir. À Adriana, por ser colo, ouvido e coração.

À Barbara, por compartilhar a sabedoria adquirida ao longo de anos de dedicação à odontologia.

À professora Dra. Letícia dos Santos Aguilera, do Instituto Politécnico da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, por sua constante solicitude e, principalmente, pela prontidão em aceitar participar da minha banca.

À professora Dra. Elaine Soares Coimbra, do Departamento de Parasitologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, por ceder gentilmente a linhagem de macrófagos murinos J774A.1 (ATCC®CCL-1 NCTC) para a avaliação celular.

À professora Dra. Ana Carolina Morais Apolônio, do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia ICB/Universidade Federal de Juiz de Fora, pela realização do teste de viabilidade celular.

À professora Dra. Laísa Araújo Cortines Laxe, da Faculdade de Odontologia da

Universidade Federal de Juiz de Fora, por toda generosidade, apoio e parceria com as pesquisas.

À professora Dra. Shirleny Fontes Santos, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (campus Zona Oeste - UERJ/ZO), pelas valiosas contribuições desde a fase de qualificação e por, mais uma vez, integrar nosso grupo como membro da minha banca examinadora.

À Gesiane, pela amizade construída a base de admiração. Ela foi o meu grande apoio no processo de formação e elaboração dessa pesquisa.

Ao Filipi, meu amigo de escaladas que virou parceiro de vida acadêmica. Com ele as reuniões intercalavam pesquisa com teorias existenciais.

À Kelly, minha coorientadora, por toda generosidade. Ela, que sempre foi diálogo aberto, tornou o processo de pesquisa leve e ainda mais instigante.

À Mônica, minha orientadora e amiga, sempre gentil e sorridente. Buscou a todo tempo estar presente além dos laboratórios. Agradeço por toda confiança depositada em mim.

Aos membros da Comissão Avaliadora, agradeço pela aceitação do convite para compô-la, pela atenção e contribuições valiosas para a conclusão deste trabalho.

Por fim, expresso minha gratidão ao Instituto Politécnico, à Universidade do Estado do Rio de Janeiro e às Agências de Fomento CNPq, CAPES, FAPERJ e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Estava ali,
quieto,
no meio das coisas miúdas.
E me encantei.

Manoel de Barros

RESUMO

CARIELLO, D. H. *Síntese de membranas híbridas para aplicação como biomaterial*. 2024. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) – Instituto Politécnico, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Nova Friburgo, 2024.

As membranas de acetato de celulose possuem uma ampla gama de aplicações, mas enfrentam algumas limitações, o que tem levado à intensificação das pesquisas no desenvolvimento de membranas híbridas. Este trabalho teve como objetivo sintetizar membranas de acetato de celulose com a adição de elementos como silício, titânio e nitrogênio em suas estruturas moleculares. Para isso, variaram-se as concentrações de TEOS (tetraetilortossilicato) e APTES (3-aminopropiltriétoxissilano), mantendo-se uma concentração fixa de TiPOT (isopropóxido de titânio). O processo de síntese envolveu as metodologias de sol-gel e inversão de fases, com adição de ácido nítrico. As membranas resultantes foram caracterizadas por diversas técnicas. A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e a refletância total atenuada (ATR) foram empregadas para identificar os grupos funcionais presentes. Análises térmicas, incluindo termogravimetria (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), foram utilizadas para avaliar a estabilidade térmica e as transições de fase das membranas. A morfologia das membranas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada à espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) para determinar a distribuição dos elementos adicionados. Além disso, foram realizados testes de viabilidade celular e biomiméticos para avaliar a bioatividade e citotoxicidade das membranas. Todas as membranas sintetizadas apresentaram uma taxa de atividade citotóxica acima de 70% da viabilidade celular, indicando baixa toxicidade e alta biocompatibilidade. Os espectros de FTIR e as curvas de TGA foram similares para todas as membranas, evidenciando estabilidade térmica e presença dos grupos funcionais esperados. A morfologia das membranas mostrou características particulares para cada variação de composição, influenciando diretamente suas propriedades mecânicas e permeabilidade. Após 45 dias de teste biomimético, todos os espectros de FTIR revelaram picos característicos de fosfatos de cálcio e carboapatita, indicando a formação de uma camada bioativa na superfície das membranas. As membranas sintetizadas nesta dissertação apresentaram as características físicas e químicas esperadas, além de resultados biológicos satisfatórios, comprovando sua bioatividade e ausência de toxicidade.

Palavras-chave: biomateriais; síntese de membranas; acetato de celulose; membranas híbridas.

ABSTRACT

CARIELLO, D. H. *Synthesis of hybrid membranes for application as a biomaterial*. 2024. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) – Instituto Politécnico, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Nova Friburgo, 2024.

Cellulose acetate membranes have a wide range of applications but face certain limitations, which have led to intensified research in the development of hybrid membranes. This work aims to synthesize cellulose acetate membranes with the addition of elements such as silicon, titanium, and nitrogen into their molecular structures. For this purpose, the concentrations of TEOS (tetraethyl orthosilicate) and APTES (3-aminopropyltriethoxysilane) were varied, while a fixed concentration of TiPOT (titanium isopropoxide) was maintained. The synthesis process involved sol-gel and phase inversion methodologies, with the addition of nitric acid. The resulting membranes were characterized using various techniques. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and attenuated total reflectance (ATR) were employed to identify the functional groups present. Thermal analyses, including thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC), were used to assess the thermal stability and phase transitions of the membranes. The morphology of the membranes was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) coupled with energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) to determine the distribution of the added elements. Additionally, cell viability and biomimetic tests were conducted to evaluate the bioactivity and cytotoxicity of the membranes. All synthesized membranes exhibited a cytotoxic activity rate above 70% of cell viability, indicating low toxicity and high biocompatibility. The FTIR spectra and TGA curves were similar for all membranes, indicating thermal stability and the presence of expected functional groups. The morphology of the membranes showed particular characteristics for each composition variation, directly influencing their mechanical properties and permeability. After 45 days of biomimetic testing, all FTIR spectra revealed characteristic peaks of calcium phosphates and carbonapatite, indicating the formation of a bioactive layer on the membrane surfaces. The membranes synthesized in this dissertation exhibited the expected physical and chemical characteristics, as well as satisfactory biological results, confirming their bioactivity and lack of toxicity.

Keywords: biomaterials; membrane synthesis; cellulose acetate; hybrid membranes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Obtenção do acetato de celulose a partir da celulose	17
Figura 2 -	Estruturas moleculares dos precursores TEOS, APTES e TiPOT	21
Figura 3 -	Etapas de homogeneização das soluções durante o processo de síntese das membranas de acetato de celulose.....	29
Figura 4 -	Preparo das amostras para o teste biomimético.	34
Figura 5 -	Espectros de infravermelho das membranas de acetato de celulose sintetizadas, (a)pura; (b)híbrida, B0/100-30; (c)híbrida, B50/50-30 e (d)híbrida, B100/0-30	36
Figura 6 -	Variação da cor e textura das membranas sintetizadas	37
Figura 7 -	Curvas das análises termogravimétricas (TG) e sua derivada (DTG) das membranas de acetato de celulose sintetizadas	38
Figura 8 -	Curvas das análises de calorimetria diferencial de varredura, DSC das membranas de acetato de celulose sintetizadas	40
Figura 9 -	Fotomicrografias das superfícies não ativas das membranas sintetizadas, 100x	42
Figura 10 -	Fotomicrografias das superfícies não ativas das membranas, 5000X	43
Figura 11 -	Fotomicrografias das superfícies não ativas da membrana de celulose pura e EDS.....	44
Figura 12 -	Fotomicrografias das superfícies não ativas membrana B0/100-30 e EDS	45
Figura 13 -	Fotomicrografias das superfícies não ativas membrana B50/50-30 e EDS	46
Figura 14 -	Fotomicrografias das superfícies não ativas membrana B100/0-30 e EDS	47
Figura 15 -	Porcentagem de crescimento celular da linhagem de macrófagos murinos J774A.1 frente a diferentes ativos e DMSO em relação ao controle de crescimento.....	48
Figura 16 -	Fotomicrografias das superfícies não ativas da membrana de acetato de celulose B0/100-30, 500X e EDS de toda imagem	50
Figura 17 -	Fotomicrografias das superfícies não ativas da membrana de acetato de celulose B0/100-30, com 2000X e EDS pontual.....	51
Figura 18 -	Fotomicrografias das superfícies não ativas da membrana de acetato de celulose B100/0-30, com 500X e EDS da imagem toda.	52
Figura 19 -	Fotomicrografias das superfícies não ativas da membrana de acetato de celulose B100/0-30, com 2000X e EDS pontual.....	52

Figura 20 - Comparação dos espectros de Infravermelho das quatro composições das membranas de acetato de celulose sintetizadas e imersas por 15, 30 e 45 dias em fluido simplificado na temperatura de 37 °C	53
Figura 21 - Restrição de 2000 a 700 cm-1 dos espectros de Infravermelho, da Figura 20, das quatro composições das membranas de acetato de celulose sintetizadas e imersas por 15, 30 e 45 dias em fluido simplificado na temperatura de 37 °C	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes utilizados na síntese das membranas de acetato de celulose híbrida.....	26
Tabela 2 - Concentração dos diferentes precursores nas amostras.....	27
Tabela 3 - Composição das membranas sintetizadas: formulação de 100 g de solução	28
Tabela 4 - Picos e variação de entalpia nos três eventos ocorridos no DSC	41
Tabela 5 - Principais picos apresentados nos espectros de infravermelho da Figura 20	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Acetato de Celulose
APTES	aminopropiltriétoxissilano
DTG	Derivada Termogravimétrica
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
H ₂ O	Água
HNO ₃	Ácido Nítrico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PA	Pro Analysis (grau de pureza analítica)
PM	Peso Molecular
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TEOS	Ortossilicato de Tetraetila
TGA	Análise Termogravimétrica
TiPOT	Isopropóxido de Titânio

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1	Acetato de celulose.....	16
1.2	Membranas	17
1.3	Materiais híbridos	18
1.4	Processo sol-gel	19
1.4.1	<u>Precursores do processo sol-gel.....</u>	<u>20</u>
1.5	A aplicação: biomateriais.....	23
1.5.1	<u>Etiologia da doença periodontal</u>	<u>23</u>
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1	Materiais.....	26
2.2	Síntese das membranas	27
2.3	Técnicas de caracterização aplicadas	30
2.3.1	<u>Espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier.....</u>	<u>31</u>
2.3.2	<u>Análise térmica.....</u>	<u>31</u>
2.3.3	<u>Microscopia eletrônica de varredura</u>	<u>31</u>
2.3.4	<u>Avaliação da viabilidade celular.....</u>	<u>32</u>
2.3.4.1	Cultura de células	32
2.3.4.2	Ensaio de viabilidade celular – método MTT	32
2.3.5	<u>Teste biomimético</u>	<u>33</u>
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
3.1	Espectroscopia de infravermelho.....	35
3.2	Análise térmica	37
3.3.	Microscopia eletrônica de varredura – MEV	41
3.4.	Avaliação da viabilidade celular	48
3.5.	Teste biomimético.....	49
4	DISCUSSÃO GERAL	56
	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58

INTRODUÇÃO

O acetato de celulose é um biopolímero derivado da celulose, presente em diversas fontes naturais. Muitos materiais utilizam o acetato de celulose como matriz, destacando-se as membranas de acetato de celulose. Estas membranas foram inicialmente aplicadas na dessalinização, mas seu uso se expandiu para a separação de proteínas, processamento de alimentos, indústria farmacêutica e outras aplicações tecnológicas (Meireles, 2007; Ribeiro, 2013).

A versatilidade dos métodos de fabricação das membranas de acetato de celulose, associada à abundância da celulose, seu baixo impacto ambiental e custo reduzido, fazem destas membranas uma escolha preferencial nas indústrias (Borges, 2018; Ferreira, 2022). No entanto, elas apresentam limitações, como baixa resistência mecânica, química e térmica, além de sensibilidade a agentes de limpeza e pouca resistência à incrustação (Habert et al., 2006; Mendes et al., 2018).

Dessa forma, há um esforço contínuo na pesquisa e desenvolvimento de membranas híbridas de acetato de celulose, tanto pela incorporação física de partículas ou nanopartículas, quanto por meio de modificações químicas com a introdução de diferentes elementos químicos nas moléculas do acetato de celulose (Peixoto et al., 2020; Andrade et al., 2021).

Mendes et al. (2018) investigaram a incorporação de silício nas membranas de acetato de celulose e suas propriedades de permeação. Os resultados mostraram que a adição de sílica à membrana híbrida, modificando a molécula de acetato de celulose com silício, melhorou significativamente a permeabilidade hidráulica. No trabalho de Faria et al. (2020), os resultados indicaram que essas membranas híbridas apresentaram maior remoção de solutos em comparação com as membranas de acetato de celulose puras.

Peixoto et al. (2020) sintetizaram membranas assimétricas integrais monofásicas de acetato de celulose/Si/Ti e acetato de celulose/Ti. Os resultados mostraram que a incorporação desses compostos melhorou significativamente a permeabilidade hidráulica, reduziu a rejeição de solutos e aumentou a resistência mecânica das membranas.

Andrade et al. (2021) focaram na obtenção de membranas de acetato de celulose/Si/N, visando melhorar a permeabilidade hidráulica, a funcionalidade química e as propriedades mecânicas das membranas. Os resultados mostraram que a incorporação desses reagentes melhorou significativamente a permeabilidade hidráulica e aumentou a resistência mecânica das membranas.

Ferreira et al. (2022) sintetizaram membranas de acetato de celulose/Si/N/Ti, com caracterização focada na cinética de degradação e no cálculo das energias de ativação da degradação. As membranas híbridas apresentaram as maiores energias de ativação de degradação, indicando maior estabilidade térmica.

Nesta dissertação, será repetida a síntese de três composições realizadas por Ferreira em 2022, com foco nas caracterizações por DSC, MEV, teste de viabilidade celular e teste biomimético.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho consistiu em sintetizar e caracterizar membranas de acetato de celulose híbridas, avaliando sua potencial aplicação como um biomaterial.

Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho consistiram em:

- Sintetizar membranas de acetato de celulose híbridas utilizando a técnica sol-gel e inversão de fases;
- Realizar a modificação química por meio da inserção do isopropóxido de titânio em concentração constante e avaliar a utilização de diferentes concentrações de ortossilicato de tetraetila e 3-aminopropiltriétoxissilano;
- Realizar a avaliação das membranas em temperatura e fluido corpóreo simplificado;
- Realizar ensaios para avaliar a viabilidade celular, indicando se as membranas sintetizadas são tóxicas para células animais;
- Caracterizar quimicamente as membranas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
- Realizar a caracterização térmica por análise termogravimétrica (TGA e DTG);
- Realizar a caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV);

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica concentra-se em cinco áreas principais: o acetato de celulose, as membranas, os materiais híbridos, o processo sol-gel e a aplicação desses materiais como biomateriais.

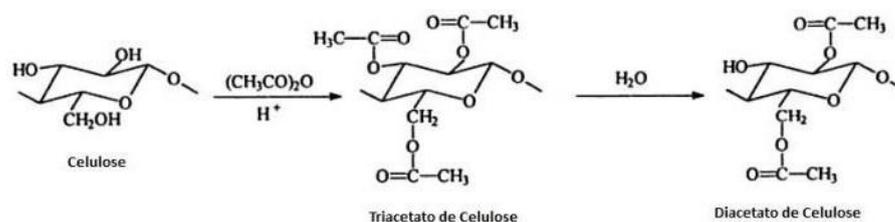
1.1 Acetato de celulose

A celulose é um polímero natural presente na parede celular das plantas (Borges, 2018). Sua extração e processamento para uso industrial remonta ao século XIX, quando a celulose foi utilizada para produção de papel. Com o tempo, outras aplicações foram desenvolvidas, incluindo a produção de fibras têxteis, filmes e plásticos. Entre os derivados de celulose, o acetato de celulose é um dos mais importantes e é frequentemente usado em aplicações nas áreas de saúde devido à sua transparência, resistência e biocompatibilidade (Borges, 2018; Rigolletto et al., 2022).

O acetato de celulose pode ser extraído de diversas fontes de celulose, como madeira, algodão e bagaço de cana-de-açúcar. A fonte escolhida influencia as propriedades finais do material, como viscosidade e solubilidade. No caso do bagaço de cana-de-açúcar, a extração do acetato de celulose pode ser realizada por meio de processos químicos, como acetilação, seguida de lavagem e secagem (Cerqueira et al., 2010).

O processo de acetilação envolve a adição de grupos acetato à cadeia de celulose, modificando suas propriedades físicas e químicas. O processo inclui a dissolução da celulose em um solvente adequado, adição de anidrido acético e um catalisador para a reação de acetilação. A reação ocorre a temperatura e tempo controlados, resultando no acetato de celulose. O material é então lavado, neutralizado e seco para remover os solventes e obter o produto final, Figura 1 (Borges, 2018).

Figura 1 - Obtenção do acetato de celulose a partir da celulose.



Fonte: Shashoua, 2008.

O grau de substituição na acetilação afeta diretamente as propriedades finais do acetato de celulose e diferentes fontes de celulose podem ser usadas na produção do material (Borges, 2018; Cerqueira et al., 2010). Um estudo de Ciolacu et al. (2011) demonstrou que a acetilação de celulose pode ser realizada em diferentes graus de substituição, que é definido como o número de grupos hidroxila substituídos por grupos acetato. O grau de substituição aumenta as propriedades como solubilidade, viscosidade e estabilidade térmica do acetato de celulose, à medida que mais grupos hidroxila são substituídos por grupos acetato.

No entanto, o acetato de celulose apresenta alguns desafios em termos de degradação, que pode ocorrer devido a processos químicos, físicos e biológicos, como exposição à luz, umidade e microrganismos (Shashoua, 2008; Feller & Wilt, 1990; Mcneill, 1992). Estudos recentes estão focados no desenvolvimento de processos mais sustentáveis para a produção de acetato de celulose, bem como em métodos adequados de conservação para preservar as características do material (Borges, 2018).

1.2 Membranas

As membranas são estruturas finas e flexíveis com diversas aplicações em áreas como a biomédica. A utilização de membranas surgiu no século XX, a partir dos trabalhos de Loeb e Sourirajan, que desenvolveram as primeiras membranas de osmose reversa. Desde então, várias técnicas de fabricação foram desenvolvidas, incluindo as técnicas de inversão de fases, que permitem o controle da morfologia das membranas. As membranas são definidas como barreiras seletivas que permitem a passagem de moléculas ou íons específicos, enquanto impedem a passagem de outras espécies químicas. Elas são compostas por uma ou várias camadas de material, como polímeros, cerâmicas, metais e vidros (Habert et al., 2006).

A simetria da membrana é importante para controlar o fluxo de massa através da membrana, e a escolha da morfologia depende da aplicação específica da membrana. As membranas podem ter diferentes morfologias, como simétricas e assimétricas. Nas membranas simétricas, a porosidade é uniforme em toda a sua espessura, enquanto nas membranas assimétricas, a porosidade varia ao longo da espessura da membrana. As membranas assimétricas são amplamente utilizadas em processos de separação, como filtração e ultrafiltração, enquanto as membranas simétricas são comumente usadas em processos de microfiltração (Medeiros, 2017).

As membranas comerciais, em sua maioria, são preparadas através da técnica da inversão de fases (Meireles et al., 2007). Nessa técnica, uma solução polimérica é preparada em uma mistura de solventes, em que um dos solventes é miscível em água e o outro não. A solução é então depositada em uma superfície plana e deixada em repouso até que ocorra a separação de fases, formando duas camadas: uma camada superior com uma alta concentração de polímero e uma camada inferior com uma baixa concentração de polímero e uma alta concentração de solvente miscível em água. Essa camada inferior é posteriormente imersa em água, fazendo com que o solvente miscível em água se difunda para o meio, formando uma membrana assimétrica com uma camada superior densa e uma camada inferior porosa (Habert et al., 2006).

Essas membranas apresentam alta porosidade e baixa resistência mecânica, o que as torna adequadas para aplicações em biomateriais. As membranas de acetato de celulose são estudadas como biomateriais para diversas aplicações, como tratamentos regenerativos periodontais (Borges, 2018) e implantes dentários (Silva et al., 2005). Além disso, estudos indicam o potencial uso em sistemas de liberação controlada de medicamentos (Ferreira et al., 2019).

1.3 Materiais híbridos

Os materiais híbridos surgiram na década de 1990 como uma alternativa aos materiais tradicionais, combinando polímeros orgânicos com materiais inorgânicos para superar suas limitações. Sua evolução se deu a partir da incorporação de novos elementos, tais como nanopartículas e complexos metal-orgânico (Das et al., 2021).

Os materiais híbridos são compostos por pelo menos duas fases que interagem em nível

molecular ou iônico, e se diferenciam dos materiais compostos por não apresentarem uma interface clara entre as fases, o que lhes confere propriedades únicas (Zarour e Abu-Reziq, 2020). Em termos de escala, esses materiais podem variar desde nano a macro escala, e as propriedades de cada fase podem ser combinadas para criar materiais com características desejáveis em termos de resistência, condutividade, capacidade de armazenamento, entre outras (Koopmann et al., 2020).

A síntese de materiais híbridos orgânico-inorgânicos representa um campo de pesquisa promissor para o desenvolvimento de materiais com propriedades otimizadas para uma ampla gama de aplicações. A integração de diferentes compostos permite uma sinergia de características, onde a fase orgânica pode proporcionar flexibilidade e absorção de luz, enquanto a fase inorgânica confere resistência mecânica e estabilidade térmica (Isoppo, 2022).

Diversas técnicas de processamento estão disponíveis para a síntese desses materiais, com destaque para a versatilidade da técnica sol-gel, que permite o controle preciso das características estruturais e funcionais (Nair et al., 2021).

1.4 Processo sol-gel

O processo sol-gel é uma técnica de síntese de materiais que teve origem na década de 1940. Segundo Danks et al. (2016), o processo remonta ao estudo de Kistler em 1932, que envolveu a remoção de líquidos de géis para produzir materiais porosos de sílica. Entretanto, foi com os trabalhos de Fraunhofer em 1835 e Ebelmen em 1846 que se passou a entender melhor o processo de hidrólise e condensação do silicato de etila. Nessa época, observaram-se os primeiros exemplos de gelificação e síntese de materiais porosos.

Os estudos de Zheng e Boccaccini (2017) concentram-se na produção de nanopartículas de vidro bioativo via sol-gel. Eles destacam as vantagens desse método em relação a outras técnicas, como alta homogeneidade, controle preciso do tamanho das partículas e baixo custo. A técnica também permite a incorporação de íons bioativos, como cálcio, fósforo e sílica, resultando em materiais com alta biocompatibilidade e bioatividade (Graziani et al., 2020).

Devido a essas propriedades, os materiais produzidos pelo processo sol-gel têm ampla aplicação, incluindo a biomedicina. Owens et al. (2016) ressaltam que os materiais sol-gel apresentam alta porosidade e grande área de superfície, o que favorece a interação com moléculas biológicas, tornando-os promissores para aplicações na área de saúde. Para uso

biomédico, contudo, é necessário que esses materiais sejam biocompatíveis e possuam propriedades específicas, como degradação e liberação controlada de medicamentos, além de bioatividade (Owens et al., 2016).

A técnica de transição sol-gel envolve dois estados principais: o "sol", uma dispersão de partículas em escala nanométrica em meio fluido, e o "gel", uma estrutura rígida formada por partículas aglomeradas. A transição ocorre à medida que as partículas se ligam, formando cadeias curtas e ramificadas, que crescem até alcançar o ponto de gel, quando as regiões sólidas se unem por meio de ligações químicas, resultando em uma estrutura sólida. Essa técnica permite o controle da composição do material, sendo realizada a baixas temperaturas, com baixo custo e relativa simplicidade (Barbosa, 2019).

O processo sol-gel é composto de duas etapas principais: hidrólise e condensação. Na hidrólise, os precursores inorgânicos são misturados a um solvente orgânico, geralmente álcool, junto com uma pequena quantidade de água, que promove a formação de grupos hidroxila (OH-) na superfície dos precursores. Na fase de condensação, esses grupos hidroxila reagem entre si, formando ligações covalentes e resultando em um gel inorgânico tridimensional (Pierre, 2020).

A cinética das etapas de hidrólise e condensação depende de fatores como a escolha do solvente, a concentração dos precursores e a presença de catalisadores. O solvente controla a velocidade das reações e a escolha do catalisador afeta diretamente as propriedades do material final (Pierre, 2020).

Na escolha dos precursores para o processo sol-gel, é importante selecionar compostos que possuam grupos funcionais reativos capazes de participar das reações de hidrólise e condensação, como alcóxidos metálicos ou metassilicato de sódio.

Dentre os precursores mais comuns estão os alcóxidos metálicos, cuja fórmula geral é $M(OR)_n$, onde "M" representa um metal ou semimetal, "R" é um radical alquil e "n" é o grau de polimerização. Alcóxidos, como tetrametoxissilano (TMOS) e ortossilicato de tetraetila (TEOS), são exemplos comuns pela facilidade com que reagem em meio aquoso, contribuindo para a formação de sílica (Pedroza, 2007; Ferreira, 2014).

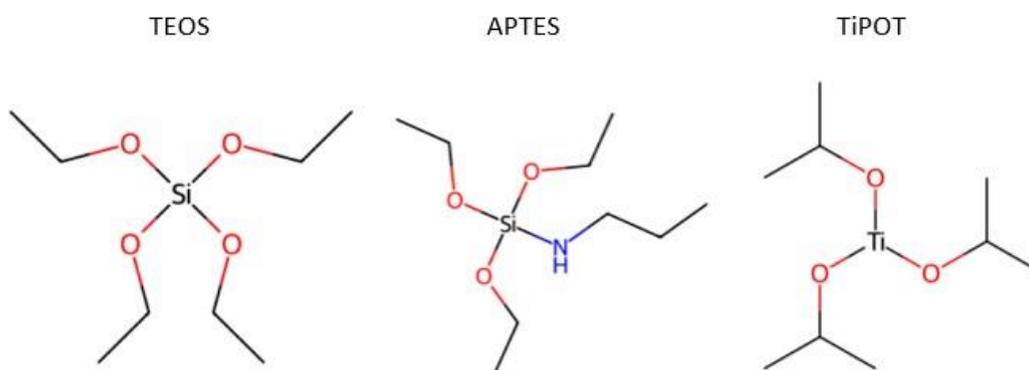
1.4.1 Precursores do processo sol-gel

Os materiais híbridos que combinam componentes orgânicos e inorgânicos têm se mostrado úteis em aplicações biomédicas (Rigoletto et al., 2022). A inclusão de aditivos

funcionais à matriz do acetato de celulose tem o potencial de provocar modificações nas propriedades físico-químicas das membranas resultantes, atribuindo funcionalidades benéficas para a sua aplicação (Ferreira, 2015). Isso se deve em grande parte à sua capacidade de melhorar a interação com tecidos biológicos e reduzir a toxicidade associada a muitos materiais convencionais (Rigoletto et al., 2022). Essas propriedades tornam as membranas híbridas uma opção promissora para aplicações em medicina regenerativa.

Na literatura, os compostos tetraetoxissilano (TEOS), 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES) e tetraisopropóxido de titânio (TiPOT) são empregados como precursores para conferir propriedades específicas a diferentes materiais (Landry et al., 1992; Yamaura et al., 2004; Soloviev et al., 2003). A estrutura molecular desses precursores está detalhada na Figura 2.

Figura 2 - Estruturas moleculares dos precursores TEOS, APTES e TiPOT.



Fonte: A autora, 2023

O TEOS é responsável por conduzir as reações de hidrólise e condensação que levam à formação da sílica na matriz das membranas, o que confere estabilidade térmica, química e mecânica ao material final, graças às ligações silanóis e grupos siloxanos formados. A literatura aponta para a utilização do TEOS em membranas à base de acetato de celulose (Andrade et al., 2021; Zarour; Abu-Reziq, 2020).

Já o APTES é capaz de direcionar e controlar reações orgânicas, introduzir propriedades de superfície como seletividade química e ajustar o desempenho mecânico, além de atuar como agente de acoplamento entre interfaces orgânico-inorgânicas de materiais híbridos, promovendo ligações covalentes de filmes orgânicos a óxidos metálicos, como silício e titânio (Andrade et al., 2021).

O TiPOT, por sua vez, funciona como precursor na reação, permitindo a formação de ligações adicionais na rede orgânica-inorgânica. Além disso, possui um potencial papel antibactericida/antimicrobiano, devido à capacidade de formar espécies reativas de oxigênio, por meio de reações de oxirredução, que levam à formação de dióxido de titânio (TiO₂). A utilização de TiPOT em membranas foi descrita em trabalhos como o de Sievers (2020) e Peixoto et al. (2020).

No processo de sol-gel, a formação do híbrido requer a ocorrência da hidrólise e a condensação. Somente após a ocorrência dessas reações, é possível obter o subproduto desejado (Pedroza, 2007; Ferreira, 2014). Em geral, quando se utiliza um precursor do tipo alcóxido metálico, as reações de hidrólise e condensação seguem um padrão de descrição semelhante, como apresentado no esquema das reações 1, 2 e 3.

Reação de Hidrólise (Ferreira, 2022):



Inicialmente, ocorre a reação do precursor alcóxido com água, resultando na formação de moléculas de álcool (ROH). Nessa etapa, ocorre a substituição parcial ou total dos grupos -OR por -OH (Pedroza, 2007; Ferreira, 2014). A formação de moléculas hidrolisadas pode desencadear outras reações, como a condensação, que produz água (2) ou álcool (3) como subproduto, como destacado por Ferreira (2014).

Reação de Condensação (Ferreira, 2022):

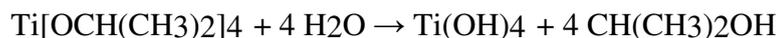


em que ROH representa o álcool.

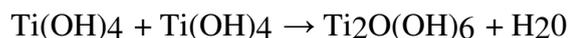
Neste contexto, apresenta-se um esquema das reações que ocorrem na síntese de materiais híbridos, destacando as etapas de hidrólise e condensação, que são fundamentais para o processo sol-gel.

1 - Síntese com TiPOT (Sievers, 2020):

Hidrólise:

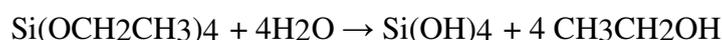


Condensação:

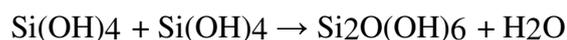


2 - Síntese com TEOS (Andrade et al., 2021):

Hidrólise:

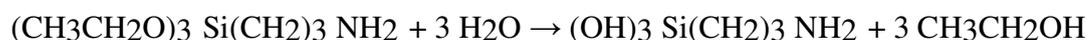


Condensação:

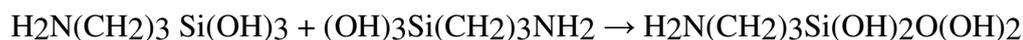


3 - Síntese com APTES (Andrade et al., 2021):

Hidrólise:



Condensação:



1.5 A aplicação: biomateriais

1.5.1 Etiologia da doença periodontal

A doença periodontal é uma patologia multifatorial que afeta os tecidos de suporte dentário, incluindo o periodonto de proteção, o periodonto de sustentação e o ligamento periodontal. Segundo Lotufo (2003), a etiologia da doença periodontal está fortemente associada à presença e quantidade de biofilme, que é um complexo de microrganismos aderidos à superfície dos dentes e da mucosa bucal, formando uma massa aderente. O biofilme é o fator principal para o desenvolvimento da doença periodontal, pois os microrganismos presentes na placa produzem fatores de virulência que desencadeiam a resposta inflamatória do hospedeiro.

O sucesso do tratamento da doença periodontal depende da remoção mecânica do biofilme dental, além de outros fatores que interferem na qualidade e quantidade da placa, como a dieta, higiene bucal, salivação e hábitos parafuncionais (Cimões, 2013).

Lotufo (2003) destaca que a etiologia da doença periodontal não se limita somente à presença do biofilme dental, mas também é influenciada por fatores modificadores, como a idade, sexo, genética, tabagismo, doenças sistêmicas, medicamentos e estresse. Esses fatores podem afetar a resposta do hospedeiro à infecção bacteriana e agravar o quadro da doença periodontal.

O tratamento da doença periodontal tem como proposta a remoção da causa, ou seja, a remoção mecânica da placa bacteriana e cálculo dental através da raspagem e alisamento radicular, associada à terapia medicamentosa e, em alguns casos, à cirurgia periodontal (Bittencourt et al., 2011). Além disso, é importante realizar um acompanhamento clínicoregular para avaliação da evolução da doença periodontal e orientação do paciente quanto à manutenção da saúde bucal.

A evolução da doença periodontal pode seguir dois caminhos, dependendo da resposta do hospedeiro à infecção bacteriana. Em indivíduos com resposta imunológica adequada, a doença periodontal pode ser controlada com a remoção da placa bacteriana e medidas de higiene bucal. No entanto, em pacientes com resposta imunológica comprometida, a doença periodontal pode evoluir para estágios mais avançados, comprometendo a estrutura de suporte do dente e levando à perda do dente (Cimões, 2013).

A Regeneração Óssea Guiada (ROG) é uma técnica empregada na Implantodontia e Periodontia para estimular a regeneração de tecidos periodontais e ósseos comprometidos por lesões ou extrações dentárias. De acordo com Dourado, Bittencourt e Tunes (2011), a ROG é um procedimento que possibilita a regeneração dos tecidos perdidos, criando um ambiente propício para a proliferação de células e tecidos saudáveis.

Para efetuar a regeneração óssea guiada, é necessário criar uma barreira física no local que se pretende regenerar, com o objetivo de separar o tecido mole do duro e permitir que as células precursoras possam migrar para o local de maneira organizada e controlada (Cimões, 2013). Segundo Lotufo (2003), as barreiras físicas empregadas na ROG podem ser absorvíveis ou não absorvíveis, sendo as absorvíveis preferidas pelos profissionais, uma vez que eliminam a necessidade de uma segunda cirurgia para remoção.

Os materiais utilizados na ROG variam de acordo com a escolha do cirurgião e do tipo de regeneração óssea desejada. Cimões (2013) menciona a utilização de enxertos ósseos autógenos, aloplásticos ou xenógenos, além de materiais de preenchimento, como hidroxiapatita e fosfato de cálcio. Dourado, Bittencourt e Tunes (2011) destacam que a seleção do material deve considerar as características do paciente, a complexidade do caso e as condições do sítio receptor.

No momento da extração dentária, a utilização de membranas como barreira física auxilia na preservação do espaço necessário para regeneração óssea (Cimões, 2013). Além da formação de osso, as membranas podem colaborar para a geração de gengiva queratinizada, por meio da técnica de Regeneração Tecidual Guiada (RTG) (Lotufo, 2003).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto contempla a síntese de membranas híbridas à base de acetato de celulose. Ainda, realizou-se a caracterização química, morfológica e a avaliação como potencial biomaterial para todas as composições apresentadas.

2.1 Materiais

Os reagentes utilizados neste projeto foram empregados sem purificação adicional. A Tabela 1 apresenta os reagentes, seus fornecedores e os respectivos graus de pureza.

Tabela 1 - Reagentes utilizados na síntese das membranas de acetato de celulose híbrida.

Reagente	Fórmula	Fabricante	Pureza (%)
Acetato de celulose	$C_6H_7O_2(OH)_3$	Sigma-Aldrich	≥ 97
Acetona (PA)	C_3H_6O	Synth	$\geq 99,6$
Formamida	CH_3NO	Êxodo Científica	$\geq 99,5$
Ortossilicato de tetraetila (TEOS)	$Si(OC_2H_5)_4$	Sigma-Aldrich	98
3-aminopropiltriétoxissilano (APTES)	$C_9H_{23}NO_3Si$	Sigma-Aldrich	≥ 98
Isopropóxido de titânio (TiPOT)	$C_{12}H_{28}O_4Ti$	Sigma-Aldrich	97%
Ácido nítrico	HNO_3	Synth	
Água destilada	H_2O	-	-

Fonte: Adaptado de Ferreira, 2022.

2.2 Síntese das membranas

Foram sintetizadas membranas híbridas à base de acetato de celulose em duas variantes distintas: as membranas de referência, compostas exclusivamente por acetato de celulose, denominada membrana pura (*AC-puro*); e o conjunto de membranas denominado *série B*, que consiste em membranas híbridas compostas de acetato de celulose e precursores dos elementos silício, nitrogênio e titânio, com a seguinte nomenclatura: *B (concentração de TEOS) / (concentração de APTES) – (concentração de TiPOT)* ou, simplificada, *B (TEOS / APTES – TiPOT)*.

Para a síntese das membranas híbridas, foram utilizados diferentes precursores: ortossilicato tetraetila, TEOS, como fonte de silício; 3-aminopropiltriétoxissilano, APTES, como fonte de silício e nitrogênio; e isopropóxido de titânio, TiPOT, como fonte de titânio. A proporção de acetato de celulose e do precursor de titânio foi mantida constante em todas as membranas híbridas sintetizadas neste trabalho.

Na Tabela 2, apresenta-se a formulação das membranas sintetizadas em termos de composição percentual dos precursores avaliados: TEOS, APTES e TiPOT. Na Tabela 3, apresentam-se as composições das membranas híbridas de acetato de celulose avaliadas neste estudo, com formulação para 100 g de solução, destacando-se o valor fixo do precursor de titânio em todas as membranas híbridas fabricadas.

Tabela 2 - Concentração dos diferentes precursores nas amostras.

Membrana	Teor de TEOS (%)	Teor de APTES (%)	Teor de TiPOT (%)
Ac-puro	0	0	0
B100/0-30	70	0	30
B50/50-30	35	35	30
B0/100-30	0	70	30

Fonte: A autora, 2023.

Tabela 3 - Composição das membranas sintetizadas: formulação de 100 g de solução.

Membrana	AC-PURO	B0/100-30	B50/50-30	B100/0-30
<i>Composição (g)</i>				
Acetato de celulose	17	16,4	16,4	16,4
Formamida	30	29	29	29
Acetona	53	51,1	51,1	51,1
TEOS	0	0	1,05	2,1
TiPOT	0	0,96	0,96	0,96
APTES	0	2,1	1,05	0
HNO ₃	0	0,7	0,7	0,7
Água destilada	-	0,5	0,5	0,5

Fonte: Adaptado de Ferreira, 2022.

Conforme o protocolo experimental adotado, a utilização de dois solventes distintos, acetona e formamida, visa evitar a separação precoce das fases durante o processo sol-gel e controlar a concentração de água e silicato, fatores que influenciam a cinética das reações características desse processo. O tipo de solvente empregado pode influenciar significativamente a velocidade das reações no processo de síntese. A acetona, por sua capacidade de miscibilidade com água e solventes orgânicos, atua como agente homogeneizante, facilitando a formação das ligações de hidrogênio entre os silanóis (Nascimento, 2002; Donatti, 2003). O ácido nítrico (HNO₃) é utilizado como catalisador em meio ácido para soluções poliméricas, resultando em uma estrutura final menos densa e mais ramificada (Andrade et al., 2021).

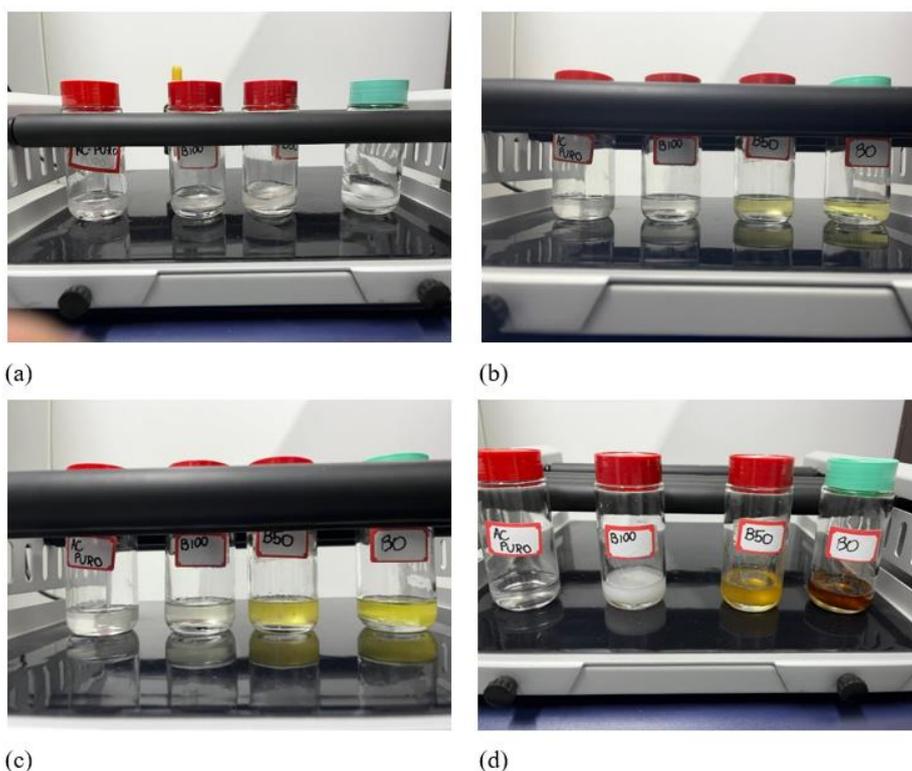
As metodologias experimentais utilizadas na síntese das membranas de referência e das membranas híbridas (série B) fundamentam-se nos estudos de Mendes et al. (2018), Faria et al. (2020), Peixoto et al. (2020) e Andrade et al. (2021). Essas abordagens seguem o protocolo de Kunst e Sourirajan (1974), que é um marco na área de membranas semipermeáveis, tendo desempenhado um papel crucial no desenvolvimento de técnicas de separação em processos como filtração e osmose reversa. Recentemente, esse protocolo foi adaptado para a síntese das membranas híbridas, incorporando inovações projetadas para otimizar tanto a estrutura quanto as propriedades funcionais

dos materiais, visando aplicações biomédicas.

Para esse processo adaptativo, foram incorporados ortossilicato de tetraetila (TEOS) e 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), que atuam como, respectivamente, alcoóxidos de silício e de aminosilano. Além disso, o alcoóxido de titânio (TiPOT) foi utilizado como precursor para o titânio, permitindo a formação de estruturas híbridas. O ácido nítrico (HNO_3) foi adicionado como catalisador, facilitando as reações químicas necessárias para a síntese das membranas híbridas e promovendo a interação entre os componentes orgânicos e inorgânicos.

Inicialmente, o acetato de celulose foi misturado com água destilada, TEOS, APTES e 50% da quantidade de formamida e acetona. Essa solução foi agitada por 8 horas para garantir uma pré-homogeneização adequada. Após esse período, o TiPOT, previamente diluído nos 50% restantes de formamida e acetona, juntamente com ácido nítrico, foi adicionado à mistura. Em seguida, a solução foi submetida a mais 16 horas de agitação, totalizando 24 horas de homogeneização. Esse processo foi realizado usando um agitador mecânico para assegurar a completa homogeneização da solução, conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3 - Etapas de homogeneização das soluções durante o processo de síntese das membranas de acetato de celulose.



Legenda: Tempo da solução no agitador mecânico: (a) 2h de agitação; (b) 4h de agitação; (c) 8h de agitação e (d) 24h de agitação.

Fonte: A autora.

Após a etapa de homogeneização, as misturas foram despejadas em placas de Petri e distribuídas uniformemente, seguindo o protocolo experimental de Mendes et al. (2018), Faria et al. (2020), Peixoto et al. (2020) e Andrade et al. (2021). A faca de espalhamento não foi utilizada, resultando na formação de membranas com espessuras variadas.

Uma vez distribuída nas placas de Petri, a mistura foi deixada em repouso por 30 segundos em uma capela de exaustão para permitir a evaporação da acetona presente no gel. Esse processo resultou em um aumento da concentração do polímero na superfície das membranas formadas.

Posteriormente, iniciou-se a etapa de inversão de fases, mergulhando as membranas em um banho de coagulação com água destilada fria. Durante essa etapa, ocorre a troca de solventes entre a matriz da membrana e o banho, levando à formação da camada ativa pela coagulação do polímero ao entrar em contato com o banho não-solvente. Simultaneamente, a camada não ativa, que atua como suporte, é formada, apresentando uma estrutura mais porosa e espessa devido às diferenças na taxa de coagulação em diferentes regiões da solução polimérica durante o processo.

Este método foi desenvolvido com o objetivo de aprimorar as características das membranas híbridas, combinando a flexibilidade do acetato de celulose com a resistência mecânica e térmica oferecida pelos elementos inorgânicos.

2.3 Técnicas de caracterização aplicadas

Após a síntese das membranas, foram empregadas técnicas de caracterização para avaliar a morfologia, a composição química, o desempenho térmico, a bioatividade e a viabilidade celular das amostras. Essas análises são essenciais para entender as propriedades físicas e químicas das membranas, além de fornecer informações sobre sua aplicabilidade em contextos biomédicos.

2.3.1 Espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier

Foi utilizado um espectrômetro PerkinElmer Frontier FTIR, equipado com o acessório de reflectância total atenuada (ATR) Pike Miracle Single Reflection ATR da Pike Technologies. As medições foram realizadas com uma resolução de 4 cm^{-1} e 256 varreduras, abrangendo a faixa espectral de 700 a 4000 cm^{-1} . As amostras foram analisadas sem qualquer tratamento prévio.

2.3.2 Análise térmica

As análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e termogravimetria (TG) foram realizadas utilizando o Analisador Térmico Simultâneo STA 6000 da Perkin Elmer. As membranas sintetizadas foram avaliadas em uma faixa de temperatura de 30°C a 600°C , com uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob um fluxo contínuo de nitrogênio a $20\text{ mL}/\text{min}$.

2.3.3 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia da superfície não ativa das membranas foi examinada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplada à espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS). O equipamento utilizado foi o Jeol, modelo JSM/6510. As amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro. As imagens de MEV das camadas inferiores, ou camada não ativa, foram capturadas com ampliações de 100, 500, 2000, 3000 e 5000 vezes. As análises químicas por EDS na superfície das membranas foram realizadas tanto pontualmente quanto em toda a imagem, com uma magnitude de 2000 vezes. As amostras, com dimensões de $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$, foram cortadas e analisadas sem qualquer processo de secagem com agentes químicos, sendo apenas retiradas da água e deixadas em temperatura ambiente.

2.3.4 Avaliação da viabilidade celular

O teste de viabilidade celular é fundamental para avaliar a compatibilidade e segurança de materiais destinados a aplicações biomédicas. Esse ensaio permite determinar a capacidade das células de sobreviver, proliferar e funcionar adequadamente em contato com o biomaterial. Para a realização desse teste, foi utilizado o método colorimétrico MTT. As amostras foram preparadas com dimensões de 4 x 4 mm e mantidas em água destilada até o momento do ensaio.

2.3.4.1 Cultura de células

A linhagem de macrófagos murinos J774A.1 (ATCC®CCL-1 NCTC), foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco), suplementados com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF – Cultilab) e 1% da solução dos antibióticos [Penicilina (100 UI/mL) e Estreptomicina (100 µg/mL) - Nova Biotecnologia], em garrafas de cultura de 75 cm³ (Nest) e mantidas em estufa incubadora umidificada à 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (Panasonic, MCO-18ACL-PA, EUA) até atingirem 80% de confluência. Todo o manuseio celular foi realizado em ambiente estéril, dentro de uma câmara de fluxo laminar vertical. O crescimento das células foi monitorado diariamente utilizando um microscópio de inversão. Para a manutenção das células em suspensão, foi realizada apenas a substituição do meio de cultura.

2.3.4.2 Ensaio de viabilidade celular – método MTT

O ensaio do MTT é um método colorimétrico que visa quantificar a atividade mitocondrial por meio da redução do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT), de cor amarela, resultando na formação de cristais de formazan, de cor púrpura, em células metabolicamente ativas. Os principais metabólitos envolvidos nesta reação, como NADH₂, NADPH e succinato, participam do ciclo de Krebs. A atividade metabólica celular, dependente do número de células, está diretamente relacionada com a quantidade de MTT metabolizada, e a quantificação é realizada por absorbância em espectrofotômetro.

As células foram cuidadosamente suspensas com auxílio de um raspador de células estéril descartável. O meio contendo as células foi recolhido e transferido para um tubo de centrifugação estéril (50 ml), seguido de centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 ml de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SBF e 1% de solução de antibióticos. As suspensões celulares foram diluídas 100 vezes em solução de contagem para a contagem em câmara de Neubauer, com o objetivo de iniciar o ensaio de viabilidade celular.

Para a avaliação da viabilidade, as células em suspensão foram transferidas para microplacas de 96 poços, com densidade celular de 2×10^4 células/poço, e incubadas por 24 horas em uma incubadora umidificada a 37 °C com 5% de CO₂. Posteriormente, o meio foi removido e adicionou-se 100 µl de meio completo (RPMI suplementado com 10% de SBF e 1% de solução de antibióticos), contendo as amostras de teste em duplicata. Como controles, foram utilizados meio RPMI (controle negativo) e meio RPMI acrescido do solvente (solução de DMSO nas concentrações de 0,2 a 0,025% v/v) como controle positivo. As placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C com 5% de CO₂.

Após esse período, 10 µl de solução de MTT (5 mg/ml) foram adicionados, e as placas foram incubadas por mais 2 horas a 37 °C com 5% de CO₂. Posteriormente, os poços foram esvaziados e o precipitado de formazan, formado pela metabolização do MTT pelas células metabolicamente viáveis, foi dissolvido em 100 µl de isopropanol ácido. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm. O cálculo da porcentagem de viabilidade celular para as células tratadas com diluições das amostras foi feito a partir das médias das respectivas absorbâncias, considerando o valor médio da absorbância do grupo controle negativo como 100% de viabilidade.

2.3.5 Teste biomimético

O teste biomimético, realizado em uma solução similar aos fluidos corpóreos (SBF) à temperatura corporal de 37 °C, é uma técnica utilizada para avaliar a bioatividade de um material. Para este ensaio, dois pedaços de cada amostra, com dimensões de 1 x 1 cm, foram colocados em tubos Falcon contendo 10 ml de solução SBF simplificada, composta por fosfato dipotássico (K₂HPO₄) e cloreto de cálcio (CaCl₂), nas quantidades de 0,2305 g e 0,2890 g, respectivamente, para 1 litro de água destilada. As amostras foram mantidas em um banho

aquecido a 37 ± 1 °C por períodos de 15, 30 e 45 dias. A troca da solução SBF foi realizada nas segundas, quartas e sextas-feiras. Na Figura 4(a), são apresentadas as amostras preparadas para o banho, enquanto a Figura 4(b) exibe a disposição dos tubos no banho de temperatura controlada.

Figura 4 - Preparo das amostras para o teste biomimético.



(a)



(b)

Legenda: (a) amostras cortadas no tamanho de 1x1 cm, com 10 ml de solução similar à corpórea e (b) amostras em banho a 37 °C.

Fonte: A autora, 2024.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A apresentação e discussão dos resultados obtidos foram organizadas em etapas, de acordo com a evolução do trabalho. Inicialmente, são apresentados os resultados das análises realizadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Em seguida, são discutidas as análises térmicas (TGA/DSC) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) das membranas sintetizadas. Por fim, são apresentados os resultados dos testes de viabilidade e proliferação celular, bem como o teste biomimético e as caracterizações realizadas após períodos de imersão de 30 e 45 dias, por FTIR, e de 18 dias, por MEV.

3.1 Espectroscopia de infravermelho

A avaliação química das amostras foi realizada via FTIR-ATR, sem prévio tratamento das membranas. Na Figura 5, são apresentados os espectros obtidos na faixa de número de onda de 4000 a 700 cm^{-1} para as membranas sintetizadas neste estudo. Todos os espectros das membranas são apresentados para duas bateladas de cada composição.

A Figura 5a mostra os espectros das membranas de acetato de celulose pura, enquanto as Figuras 5b, 5c e 5d correspondem às membranas híbridas, com concentração constante de TiPOT (30%) e variações nas concentrações de TEOS e APTES. A nomenclatura das membranas híbridas segue a lógica: B(%TEOS)/(%APTES)–(%TiPOT). Na Figura 5b apresentam-se os espectros das membranas de acetato de celulose híbrida, sem adição de TEOS; com adição máxima de APTES, denominadas B0/100 – 30. A Figura 5c mostra os espectros das membranas de acetato de celulose híbrida, com iguais concentrações de TEOS e APTES, denominadas B50/50 – 30. A figura 5d mostra os espectros das membranas de acetato de celulose híbrida, com adição de TEOS, e sem adição de APTES, denominadas B100/0–30.

Os espectros das membranas de acetato de celulose pura (AC-PURO) e das membranas híbridas estão em concordância qualitativa com os espectros FTIR-ATR de membranas de acetato de celulose hidratadas, conforme relatado por outros autores (Mendes et al., 2018; Faria et al., 2020; Peixoto et al., 2020; Andrade et al., 2021).

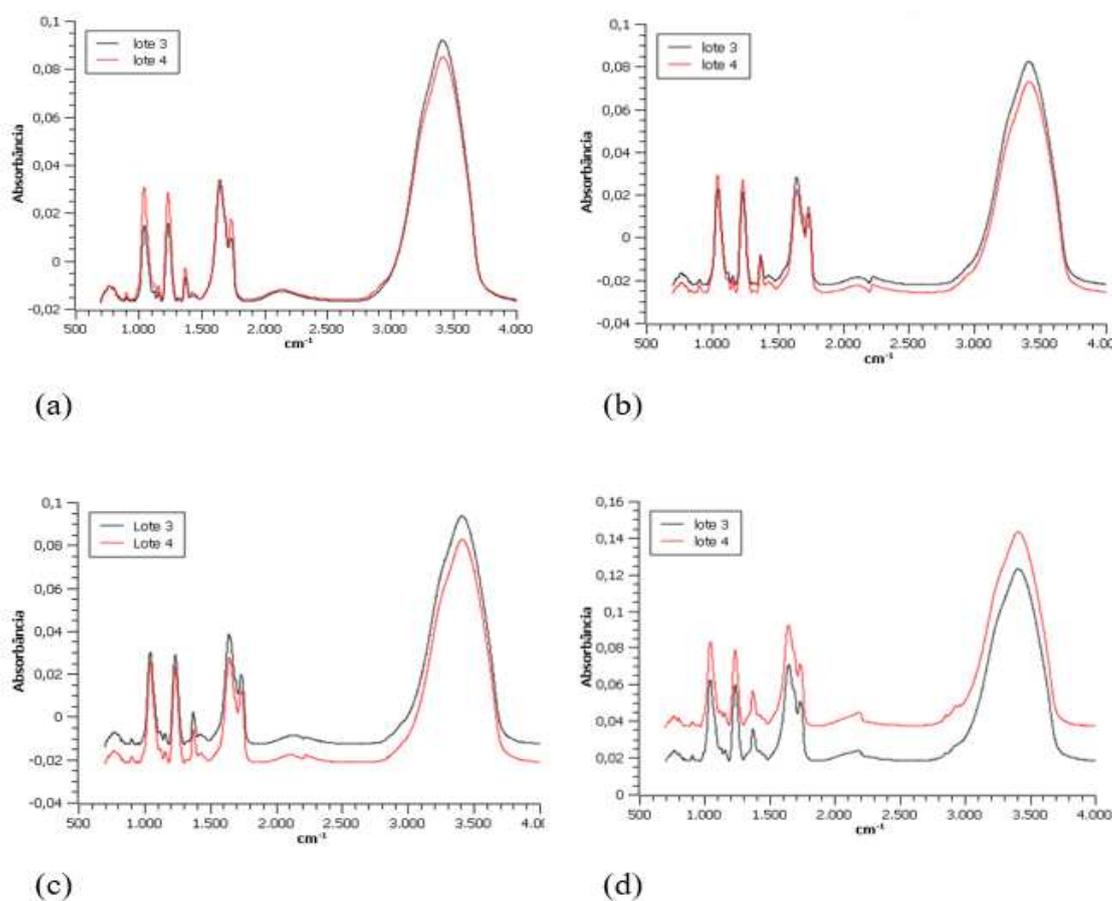
Os espectros mostram que as bandas mais intensas para as membranas de acetato de celulose, tanto puras quanto híbridas, são encontradas em aproximadamente 1046 cm^{-1} , 1238 cm^{-1} , 1655 cm^{-1} , 1745 cm^{-1} e 3410 cm^{-1} . As bandas em 1046 cm^{-1} e 1238 cm^{-1} são atribuídas

às vibrações dos grupos acetato (C-O-C) nos modos simétrico e assimétrico, respectivamente. A banda em 1655 cm^{-1} refere-se às vibrações dos grupos O-H de moléculas de H_2O adsorvidas.

A banda larga entre 3000 e 3700 cm^{-1} é atribuída ao estiramento O-H, que pode ser devido a moléculas de água, precursores hidrolisados de sílica e titânio, ou grupos hidroxila em Si-OH e C-OH. O pico em aproximadamente 3420 cm^{-1} é referente ao estiramento dos grupos OH não esterificados na celulose (Klaai et al., 2022; Mendes et al., 2018; Faria et al., 2020).

A banda em 1745 cm^{-1} está associada às vibrações de estiramento forte da carbonila (C=O). A diminuição da intensidade desta banda indica que os grupos carbonila estão sendo removidos da molécula de acetato de celulose por interação com Ti-O-C e/ou Si-O-C. Além disso, os deslocamentos das bandas de absorção em 3440 cm^{-1} , 1752 cm^{-1} e $1095\text{-}1049\text{ cm}^{-1}$ correspondem, respectivamente, à deformação axial das hidroxilas (OH), deformação axial da carbonila de ésteres (C=O) e deformação axial de C-O-C de éter.

Figura 5 - Espectros de infravermelho das membranas de acetato de celulose sintetizadas, (a) pura; (b) híbrida, B0/100–30; (c) híbrida, B50/50–30 e (d) híbrida, B100/0–30.

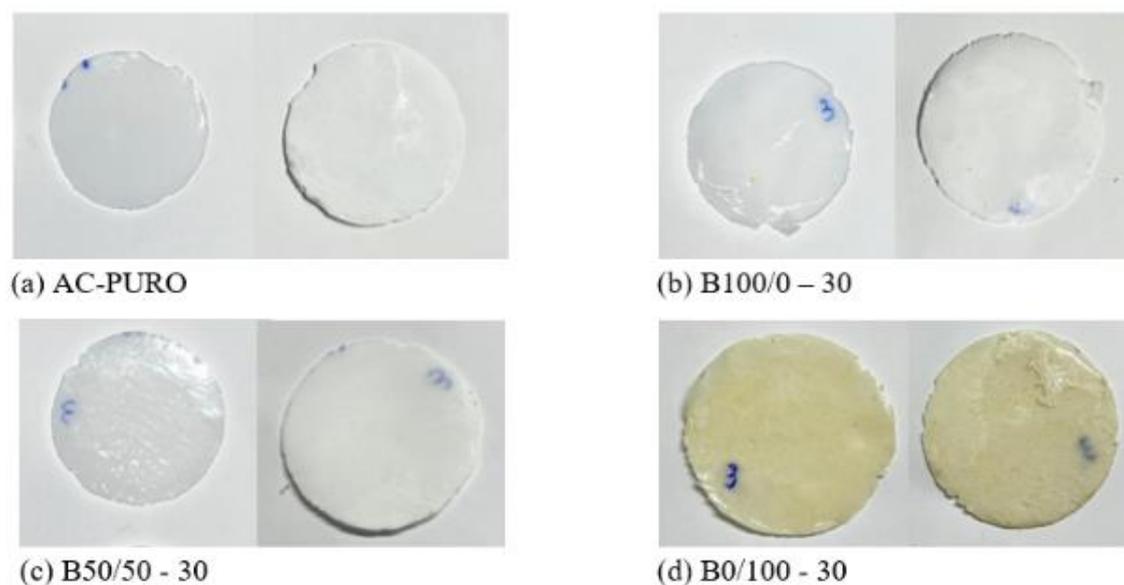


Fonte: A autora, 2022.

Software: Scidavis, v.2.4.0.

Pode-se observar na Figura 5 que os quatro espectros de FTIR das membranas sintetizadas são bastante similares entre si e se assemelham às composições de membranas relatadas na literatura. No entanto, a textura, a cor e a manipulação das membranas diferem significativamente. Essas características podem ser visualizadas na Figura 6.

Figura 6 - Variação da cor e textura das membranas sintetizadas.



Legenda: Imagens da parte ativa e não ativa das membranas sintetizadas. (a) Membrana pura; (b) Membrana híbrida, B0/100 - 30; (c) Membrana híbrida, B50/50 - 30 e (d) Membrana híbrida, B100/0 - 30.

Fonte: A autora, 2024.

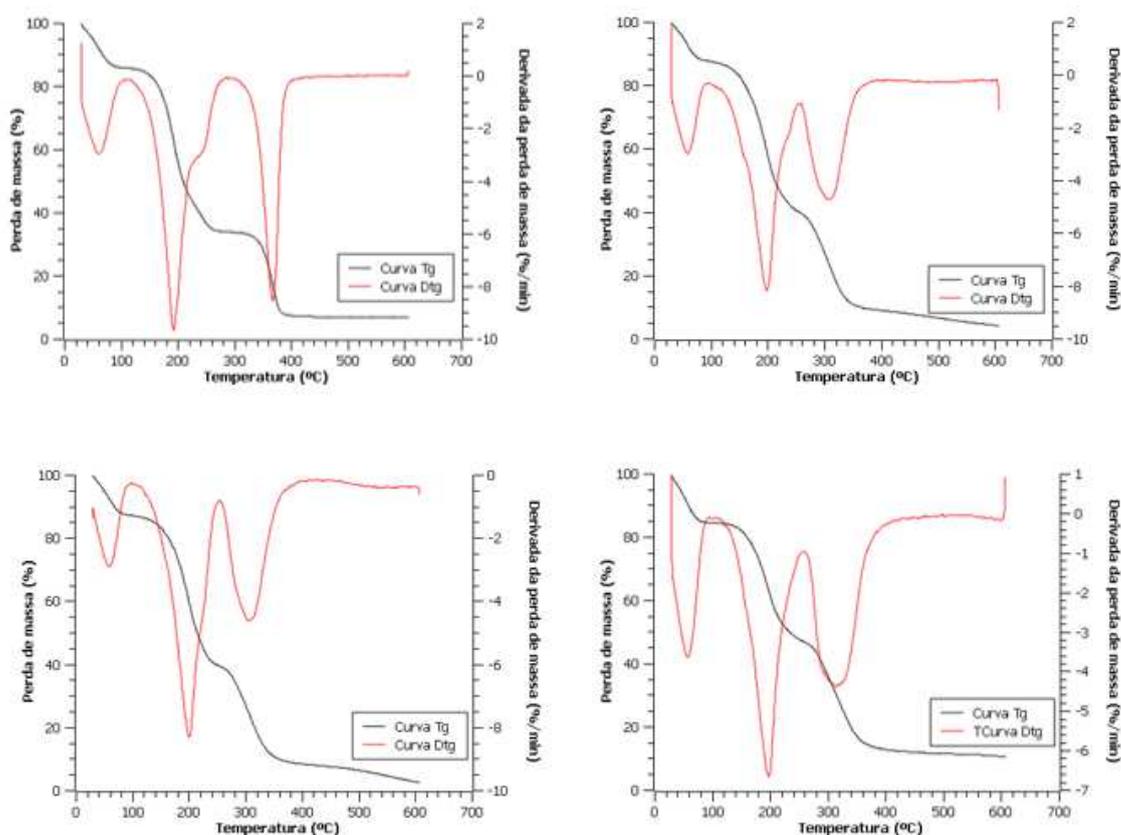
3.2 Análise térmica

Na Figura 7, são apresentadas as análises termogravimétricas (TG) e as derivadas termogravimétricas (DTG) de todas as composições das membranas sintetizadas. Observa-se que ocorrem eventos térmicos em três estágios distintos. O primeiro evento, em temperaturas inferiores a 100 °C, está associado à perda de massa, indicando a possível perda de água adsorvida. O segundo evento, também associado à perda de massa, ocorre entre 110 e 270 °C e indica a degradação da celulose. O terceiro evento, com perda de massa, ocorre entre 255 e 410 °C, indicando a possível carbonização do material.

A faixa de temperatura dos eventos das análises termogravimétricas das membranas apresenta uma pequena variação com a composição; no entanto, observa-se um padrão de

comportamento térmico consistente entre as membranas sintetizadas neste trabalho, similar ao encontrado em outras membranas de acetato de celulose avaliadas na literatura (Mendes et al., 2018; Faria et al., 2020; Peixoto et al., 2020; Andrade et al., 2021; Ribeiro, 2013; Subramanian et al., 2021).

Figura 7 - Curvas das análises termogravimétricas (TG) e sua derivada (DTG) das membranas de acetato de celulose sintetizadas, (a) pura; (b) híbrida, B0/100–30; (c) híbrida, B50/50–30 e (d) híbrida, B100/0–30.



Fonte: A autora.

Software: Scidavis, v.2.4.0.

Devido a essas diferenças, e dando continuidade ao trabalho deste grupo de pesquisa, Santos et al. (2022) propuseram a utilização de algoritmos de aprendizado de máquina para explorar e classificar os dados de análises termogravimétricas das membranas de acetato de celulose puras e híbridas. Foram aplicados os algoritmos *Extra-Trees Classifier*, *Random Forest*, *Decision Tree* e *K-Nearest Neighbors* (KNN) a esses dados. Os pontos experimentais das temperaturas relacionados com as massas foram tratados de diferentes maneiras para

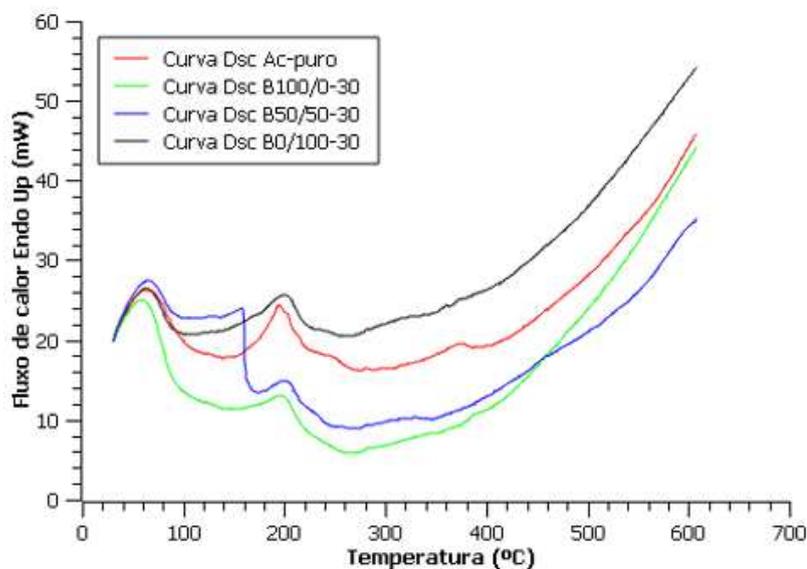
correlacionar a composição química da amostra com a curva de perda de massa. Os algoritmos avaliados demonstraram grande capacidade em perceber as pequenas diferenças no perfil termogravimétrico das membranas e correlacioná-las com sua composição química. Dentre os algoritmos estudados, o *Extra-Trees Classifier* obteve a melhor resposta, com 90% de acurácia (Santos et al., 2022; 2023).

Além disso, as membranas híbridas foram avaliadas quanto à cinética de degradação térmica, com base nos resultados da análise termogravimétrica. Observou-se que as temperaturas dos três picos de DTG das membranas híbridas ocorrem em níveis inferiores aos da membrana pura, sugerindo uma diminuição da resistência térmica, especialmente para as amostras funcionalizadas com APTES, que apresentam perda de massa quase nula, um comportamento não observado nas amostras com TEOS. O conhecimento da estabilidade térmica é fundamental para a aplicação dessas membranas.

Nesse contexto, Ferreira et al. (2022) estudaram a degradação térmica das membranas utilizando métodos isoconversionais. Os resultados indicaram que a adição de silício à molécula de acetato de celulose elevou a energia de ativação da degradação de 240,28 kJ/mol (AC-Puro) para 1.039,01 kJ/mol (membrana híbrida funcionalizada apenas com TEOS), conforme o método de Friedman, sugerindo uma maior estabilidade térmica. A energia de ativação (E_a) também foi estimada pelo método isoconversional proposto por Flynn-Wall-Ozawa (FWO) (Ferreira et al., 2022). Para a amostra de referência, AC-Puro, a energia de ativação encontrada na primeira e segunda batelada foi de 233,5 kJ/mol e 219,05 kJ/mol, respectivamente. A amostra B0/100-30, com APTES (contendo grupamento amino e silano), apresentou valores de 310,31 kJ/mol e 226,05 kJ/mol, enquanto a membrana B100/0-30, com TEOS (sem grupamento amino), alcançou 452,73 kJ/mol e 424,74 kJ/mol para a primeira e segunda batelada, respectivamente. Esses resultados evidenciam que a mínima variação na composição química pode ser detectada por métodos cinéticos, permitindo uma avaliação mais precisa da estabilidade térmica das membranas de acetato de celulose (Ferreira et al., 2021; Ferreira et al., 2022).

Na Figura 8, são apresentadas as curvas de calorimetria diferencial de varredura (DSC), que exibem três picos exotérmicos em aproximadamente 61 °C, 195 °C e 370 °C, associados à perda de massa, com variações de entalpia de 220,6293 J/g, 174,0386 J/g e 49,9303 J/g, respectivamente.

Figura 8 - Curvas das análises de calorimetria diferencial de varredura, DSC das membranas de acetato de celulose sintetizadas.



Software: Scidavis, v.2.4.0.

Fonte: A autora, 2024.

A Tabela 4 apresenta as variações de entalpia para as quatro amostras sintetizadas. Conforme a teoria, todo pico na derivada da análise termogravimétrica (DTG) deve corresponder a um evento de perda de massa na análise termogravimétrica (TG). No entanto, esse comportamento não foi observado nas membranas sintetizadas neste estudo. O evento entre 255 °C e 410 °C, caracterizado por uma significativa perda de massa, não apresentou pico distinto, ou a variação de entalpia foi muito pequena, conforme indicado na Tabela 4. Esse resultado pode ser atribuído ao tipo de amostras utilizadas ou a possíveis limitações do equipamento empregado. Em temperaturas elevadas, o DSC pode não estar detectando adequadamente a variação do fluxo de calor.

Tabela 4 - Picos e variação de entalpia nos três eventos ocorridos no DSC.

		Primeiro evento	Segundo evento	Terceiro evento
AC-Puro	Pico (°C)	61,59	195,13	367,72
	Entalpia (J/g)	220,6293	174,0385	49,9303
B0/100 - 30	Pico (°C)	58,25	198,73	Não encontrado
	Entalpia (J/g)	133,2857	164,2190	
B50/50 - 30	Pico (°C)	62,27	203,44	322,79
	Entalpia (J/g)	194,7496	87,5775	22,2577
B100/0 - 30	Pico (°C)	64,18	199,47	Não encontrado
	Entalpia (J/g)	292,1269	58,1432	

Fonte: A autora, 2024.

Por outro lado, pode-se observar que há uma variação na entalpia com a composição da membrana, especialmente no primeiro evento. Como este evento está relacionado à água adsorvida, a amostra sintetizada sem TEOS, B0/100–30, pode adsorver menos água na sua superfície, resultando em uma menor variação de entalpia e, conseqüentemente, menor energia. Isso sugere que a superfície pode ser menos rugosa. No entanto, essa menor rugosidade não é observada na microscopia eletrônica de varredura. A coloração amarelada desta membrana, conforme mostrado na Figura 6(d), difere das outras três amostras, o que pode indicar alguma propriedade específica da superfície que justifique a menor variação de entalpia.

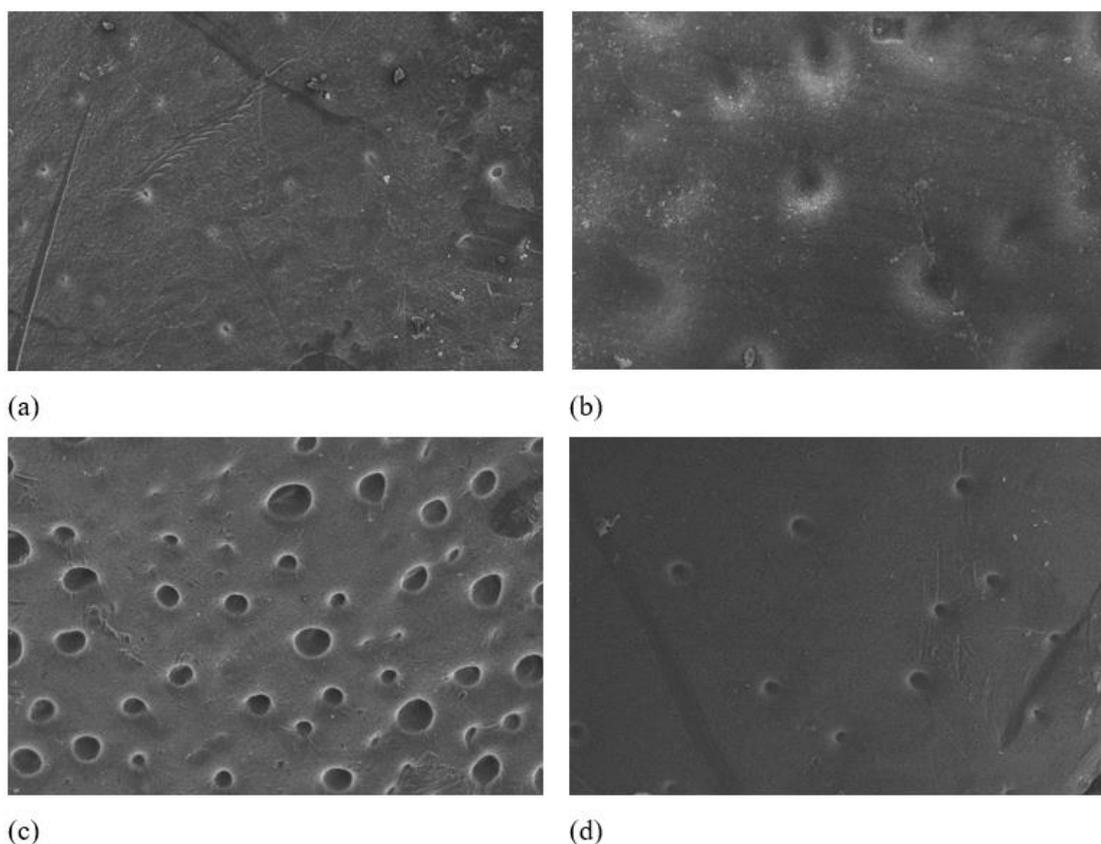
O segundo evento, entre 110 °C e 270 °C, relacionado à degradação da celulose, apresentou as menores variações de entalpia nas amostras B50/50–30 e B100/0–30. Isso indica que essas amostras necessitam de menos energia para a degradação da celulose, sugerindo uma maior facilidade para degradar e menor estabilidade térmica. Portanto, as amostras com maior variação de entalpia, como B0/100–30 e AC-Puro, apresentam maior estabilidade térmica.

3.3. Microscopia eletrônica de varredura – MEV

A Figura 9 mostra a morfologia da superfície não ativa das membranas sintetizadas com uma ampliação de 100 vezes, proporcionando uma análise mais representativa das características gerais das membranas. A membrana com igual porcentagem de TEOS e APTES,

denominada B50/50-30, apresentou a maior porosidade na superfície não ativa. Em contraste, a membrana de acetato de celulose pura (AC puro), a membrana híbrida com precursor de titânio, sem TEOS e com APTES (B0/100-30), e a membrana híbrida com precursor de titânio, com TEOS e sem APTES (B100/0-30), exibiram morfologias similares, com menos porosidade.

Figura 9 - Fotomicrografias das superfícies não ativas das membranas sintetizadas, 100x.



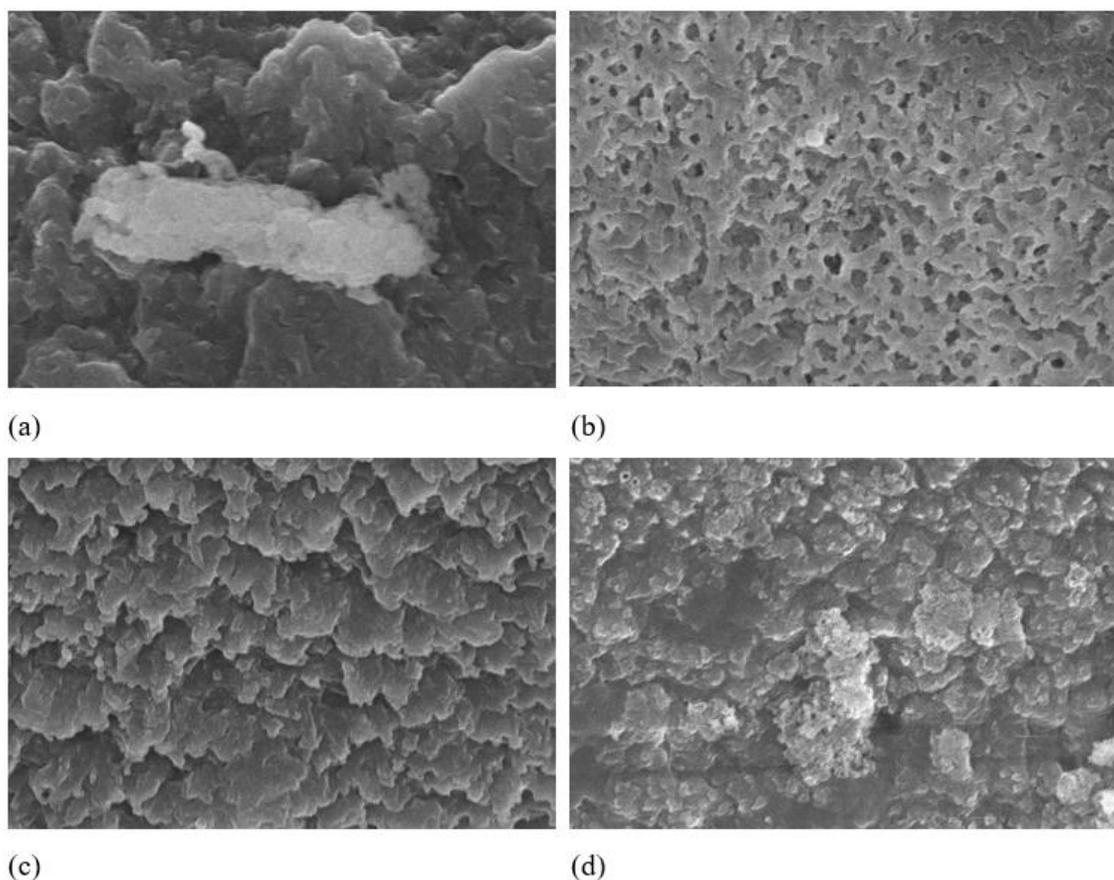
Legenda: (a) acetato de celulose pura, AC puro; (b) híbrida com precursor de titânio, sem TEOS e com APTES, B0/100-30; (c) híbrida com precursor de titânio, TEOS e APTES na mesma concentração, B50/50-30; (d) híbrida com precursor de titânio, com TEOS e sem APTES, B100/0-30.

Fonte: A autora, 2024.

Essas observações não se mantêm quando a ampliação é aumentada. Na Figura 10, com uma ampliação de 5000 vezes, apenas duas amostras apresentam morfologias similares. As morfologias das superfícies não ativas da membrana híbrida sem TEOS (B0/100-30) e da membrana híbrida com somente TEOS (B100/0-30) são similares. Em contrapartida, as

superfícies não ativas da membrana de acetato de celulose pura (AC puro) e da membrana híbrida com 50% de TEOS e 50% de APTES (B50/50–30) exibem morfologias bem distintas. A membrana B50/50–30 apresenta uma estrutura semelhante a agulhas, enquanto a membrana de acetato de celulose pura (AC puro) demonstra uma estrutura mais densa.

Figura 10 - Fotomicrografias das superfícies não ativas das membranas, 5000X.



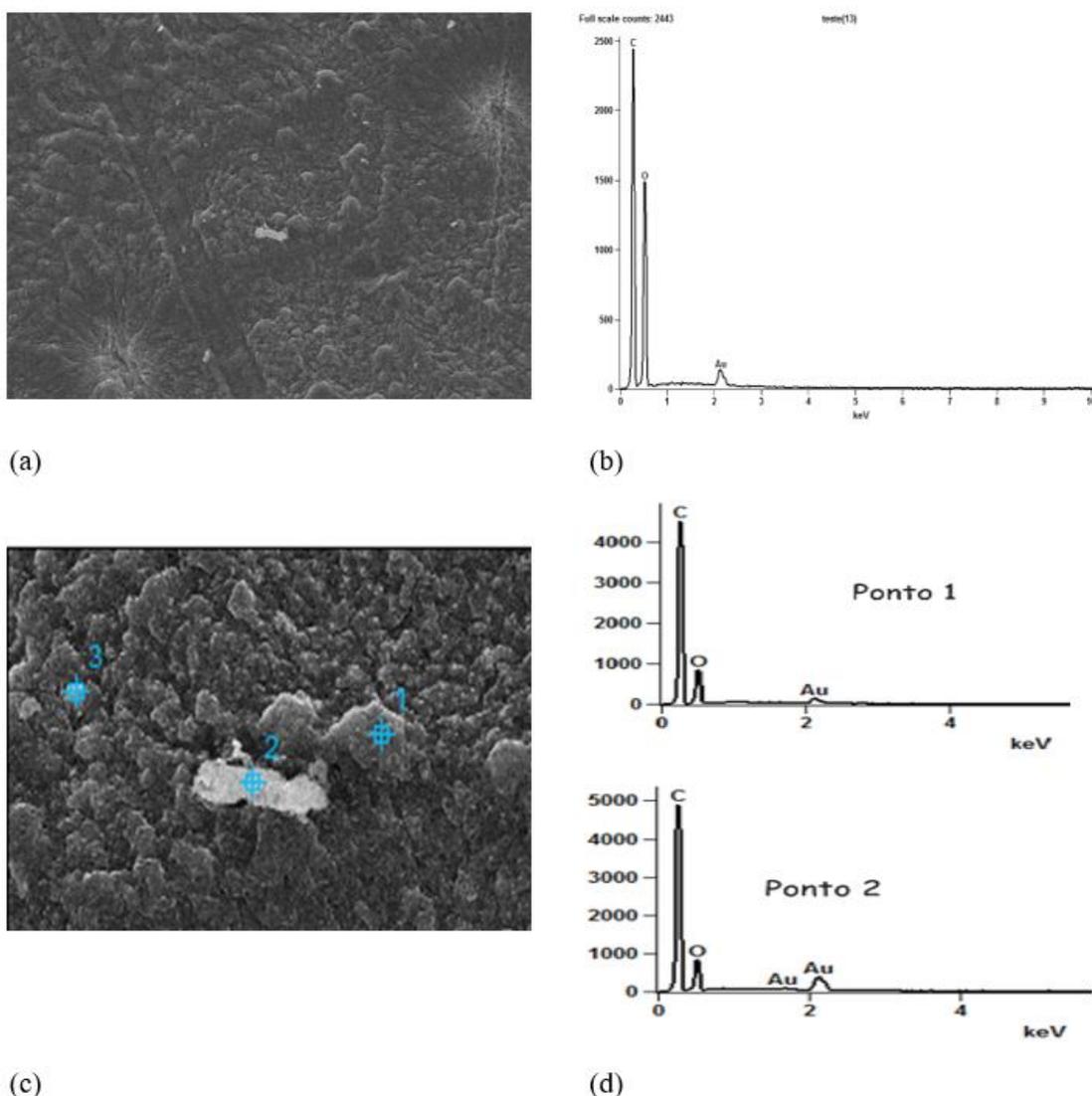
Legenda: (a) acetato de celulose pura, AC puro; (b) híbrida com precursor de titânio, sem TEOS e com APTES, B0/100–30; (c) híbrida com precursor de titânio, TEOS e APTES na mesma concentração, B50/50–30; (d) híbrida com precursor de titânio, com TEOS e sem APTES, B100/0–30.

Fonte: A autora, 2024.

Apesar das diferenças pontuais nos níveis de intensidade observadas nas membranas de acetato de celulose pura (AC Puro), a análise por energia dispersiva de raios X (EDS) revelou uma composição homogênea. A fotomicrografia mostrada na Figura 11(a) e (b), com uma ampliação de 500 vezes, apresenta uma visão representativa, enquanto o espectro EDS da imagem completa indica a presença exclusiva de oxigênio e carbono. Além disso, os espectros pontuais em diferentes regiões da imagem ampliada 2000 vezes, conforme mostrado na Figura

11(c) e (d), confirmam a existência apenas de carbono e oxigênio, que são componentes da estrutura polimérica do acetato de celulose.

Figura 11 - Fotomicrografias das superfícies não ativas da membrana de celulose pura e EDS.

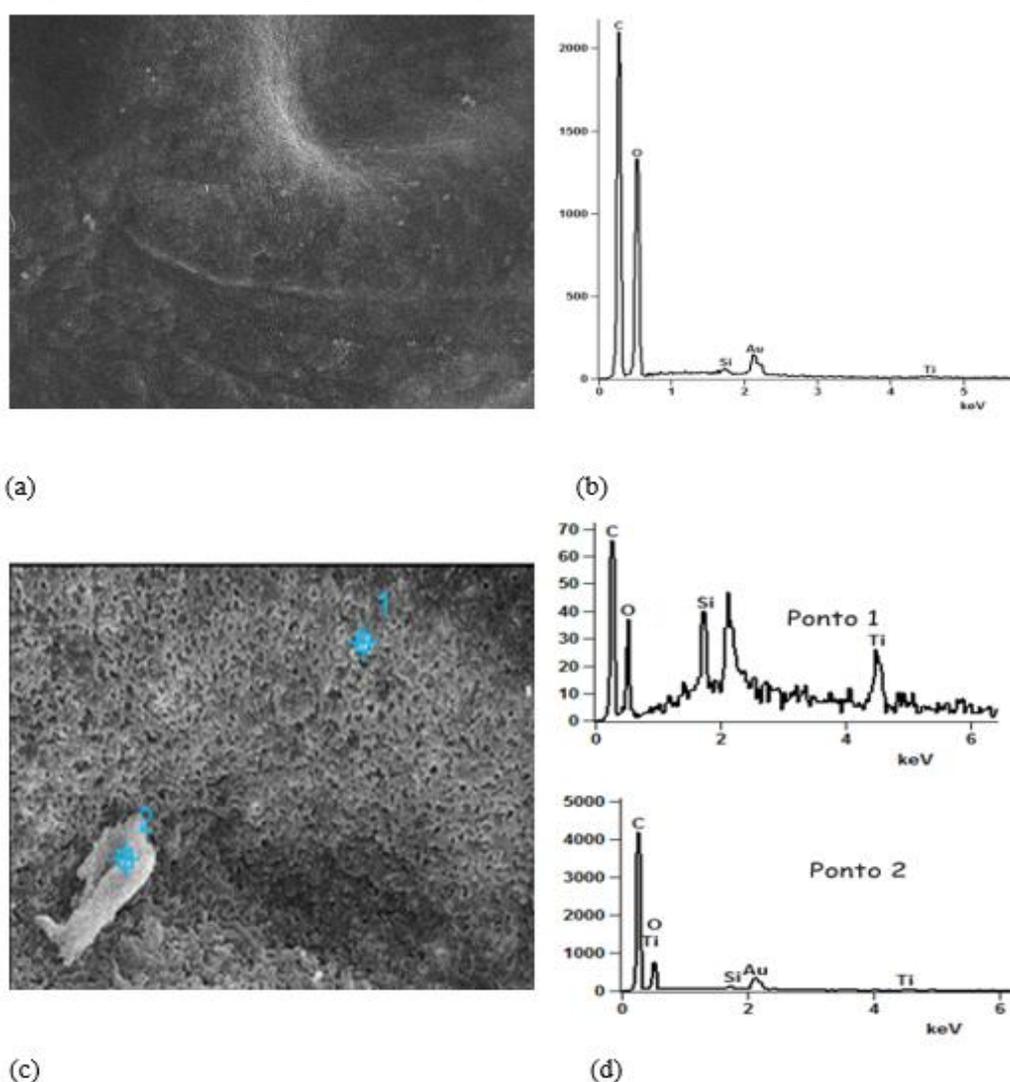


Legenda: (a) Fotomicrografias das superfícies não ativas da membrana de celulose pura, AC puro; com 500x; (b) Espectro de EDS da imagem da fotomicrografia (a); (c) Fotomicrografias das superfícies não ativas da membrana de celulose pura, AC puro; com 2000x; (d) Espectro de EDS dos pontos 1 e 2 da imagem da fotomicrografia (c).
Fonte: A autora, 2024.

A Figura 12 apresenta a microscopia e análise EDS da membrana B0/100–30, sem adição de TEOS. As fotomicrografias das imagens nas Figuras 12(a) e 12(b), com uma

ampliação de 500x, fornecem uma visão representativa, enquanto o espectro EDS da imagem completa revelou a presença predominante de oxigênio e carbono, com indícios de silício e titânio. Observando a escala, se ajustada como mostrado na Figura 12(d), poderia haver picos mais pronunciados de titânio e silício. Além disso, os espectros pontuais em diferentes regiões da imagem ampliada 2000 vezes, como mostrado nas Figuras 12(c) e 12(d), confirmam a existência apenas de carbono e oxigênio, que são componentes da estrutura polimérica do acetato de celulose.

Figura 12 - Fotomicrografias das superfícies não ativas membrana B0/100–30 e EDS.



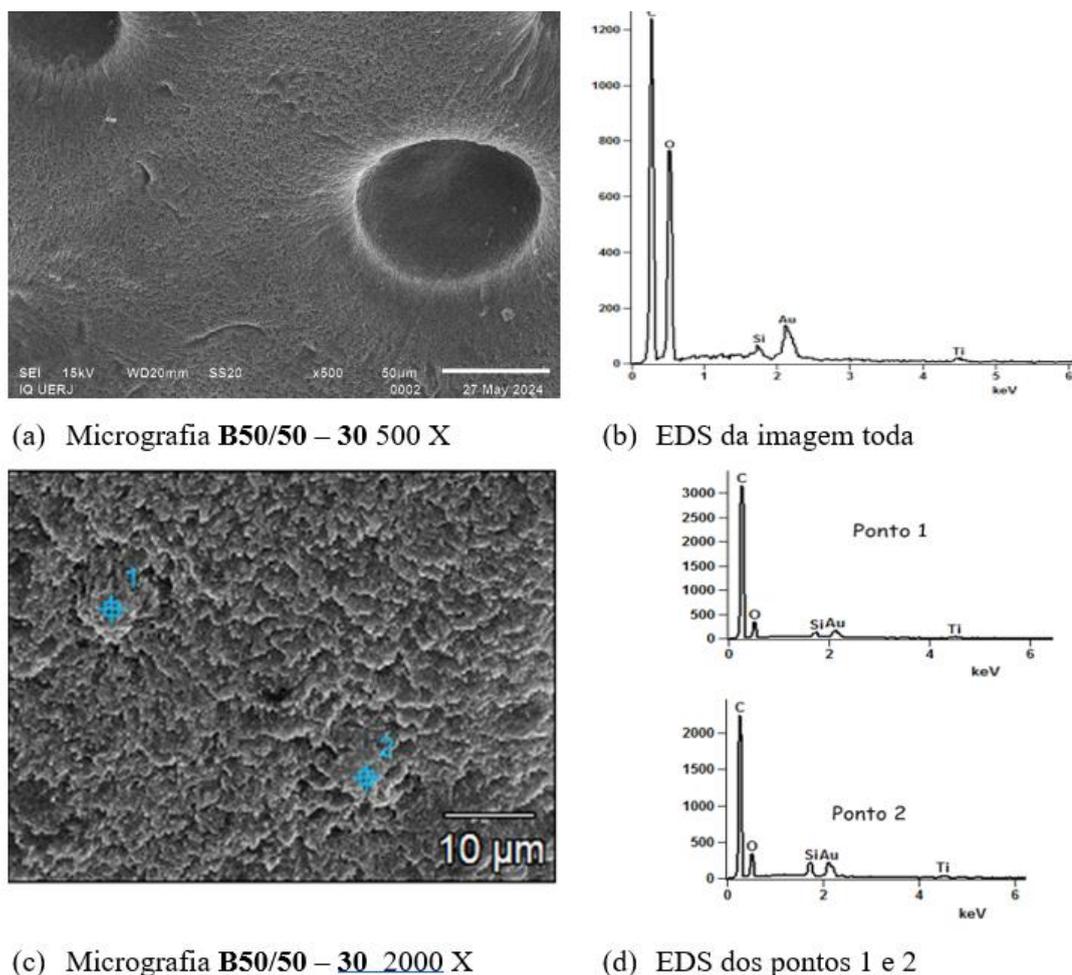
Legenda: (a) Fotomicrografias das superfícies não ativas membrana B0/100 - 30, com 500X; (b) Espectro de EDS da imagem da fotomicrografia (a); (c) Fotomicrografias das superfícies não ativas da membrana de celulose pura, membrana B0/100 - 30; com 2000X e (d) Espectro de EDS dos pontos 1 e 2 da imagem da fotomicrografia (c).

Fonte: A autora, 2024.

A fotomicrografia nas Figuras 12(c) e 12(d), com ampliação de 2000x, mostra o espectro EDS da imagem completa, indicando a presença predominante de oxigênio e carbono, com indícios de silício e titânio. Já na análise pontual, o ponto 1, que apresenta um tom de cinza mais escuro e representa a maior parte da membrana, revelou quantidades significativas de silício e titânio.

Ao avaliar a amostra B50/50–30, que possui iguais quantidades de TEOS e APTES, o espectro EDS da imagem inteira, com ampliação de 500 vezes, apresentou um pequeno pico de silício e uma quantidade mínima de titânio, conforme mostrado nas Figuras 13(a) e 13(b). Diferente das outras amostras, esta não exibiu variações de contraste na imagem ampliada 2000 vezes, Figura 13(c). A análise por energia dispersiva de raios X mostra que os picos e as intensidades dos espectros pontuais foram similares.

Figura 13 - Fotomicrografias das superfícies não ativas membrana B50/50 – 30 e EDS.

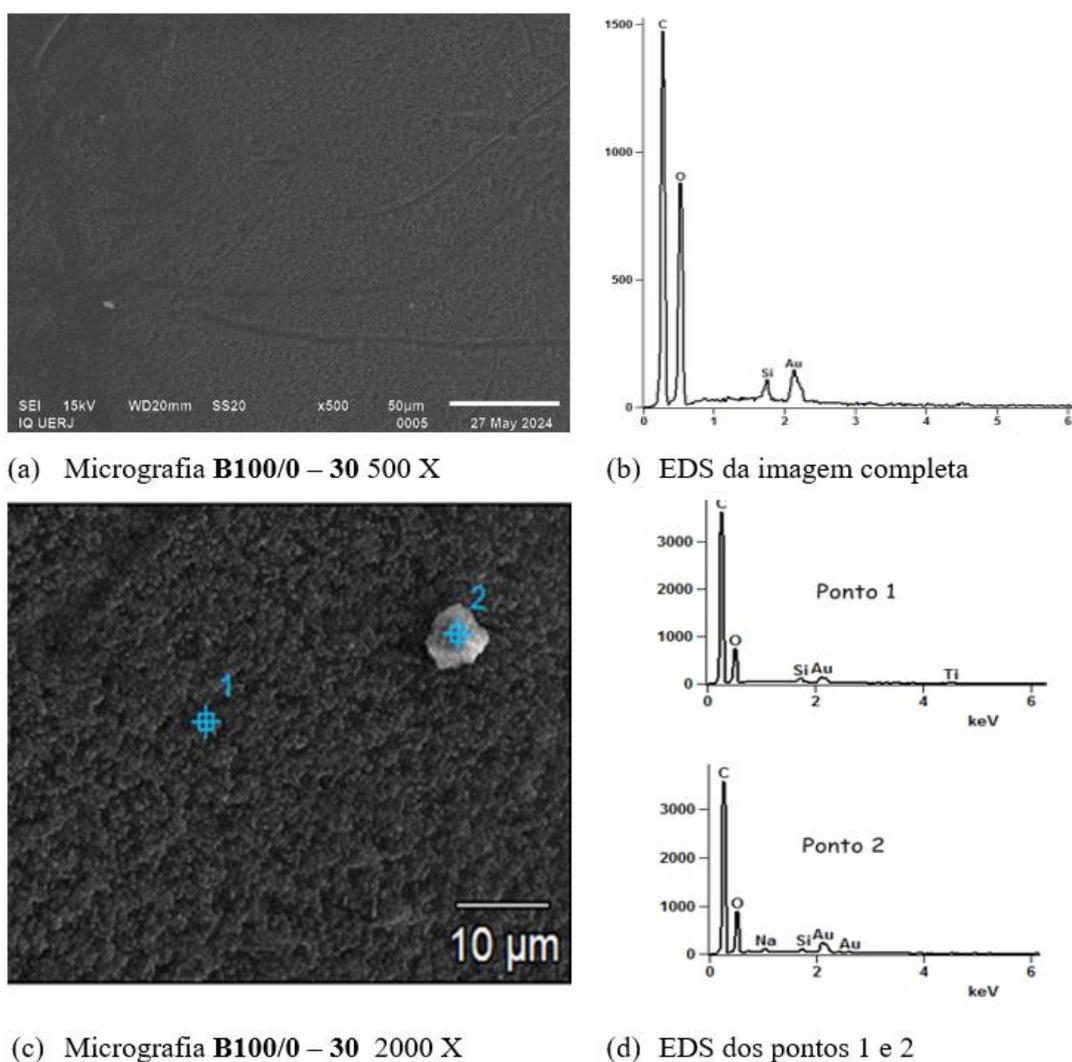


Legenda: (a) Fotomicrografia da superfície não ativa da membrana B50/50–30, com 500X; (b) Espectro de EDS da imagem da fotomicrografia (a); (c) Fotomicrografia da superfícies não ativa da membrana de celulose pura, membrana B50/50–30; com 2000X e (c) Espectro de EDS dos pontos 1 e 2 da imagem da fotomicrografia (c).

Fonte: A autora, 2024.

A amostra B100/0–30 foi sintetizada sem o uso do alcóxido APTES, empregando apenas os alcóxidos TEOS e TiPOT. Os espectros EDS da imagem completa, com ampliação de 500 vezes, mostrados nas Figuras 14(a) e 14(b), assim como os espectros dos pontos específicos realizados com ampliação de 2000 vezes, nas Figuras 14(c) e 14(d), foram similares. Mesmo no ponto com tom de cinza mais claro, o espectro EDS mostrou-se semelhante ao ponto 2, com tom de cinza mais escuro, e ao espectro da imagem completa com ampliação de 500 vezes.

Figura 14 - Fotomicrografias das superfícies não ativas membrana B100/0–30 e EDS.



Legenda: (a) Fotomicrografia da superfície não ativa da membrana B100/0–30, com 500X; (b) Espectro de EDS da imagem da fotomicrografia (a); (c) Fotomicrografia da superfície não ativa da membrana de celulose pura, membrana B100/0–30; com 2000X e (d) Espectro de EDS dos pontos 1 e 2 da imagem da fotomicrografia (c).

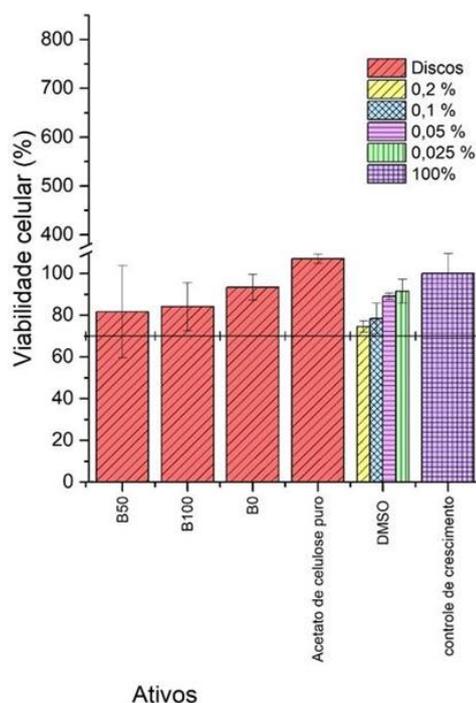
Fonte: A autora, 2024.

A análise por energia dispersiva de raios X (EDS) não é quantitativa. Devido às diferenças de nível nas superfícies das amostras, o detector pode registrar variações na intensidade dos elementos químicos. Além disso, a técnica possui um limite de detecção, o que pode impedir a identificação de determinados elementos químicos presentes em baixas concentrações na amostra.

3.4. Avaliação da viabilidade celular

A Figura 15 apresenta a porcentagem de viabilidade das células da linhagem J774A.1 em relação aos diferentes discos testados, comparados com o controle de crescimento. De acordo com a norma ISO 10993-5, se a viabilidade celular for inferior a 70%, o material é considerado potencialmente citotóxico. Com base nessa normativa, os dados mostrados na Figura 15 indicam diferentes taxas de atividade citotóxica para os materiais testados. No entanto, todas as membranas sintetizadas apresentaram uma viabilidade celular superior a 70%, indicando que não possuem potencial citotóxico.

Figura 15 - Porcentagem de crescimento celular da linhagem de macrófagos murinos J774A.1 frente a diferentes ativos e DMSO em relação ao controle de crescimento.



Fonte: A autora, 2024.

3.5. Teste biomimético

As soluções similares ao fluido corpóreo (SBF) têm sido amplamente utilizadas após a constatação de que elas permitem a formação de diferentes fosfatos de cálcio *in vitro*, sem a necessidade de células vivas. A parte mineral do tecido ósseo é formada por fosfato de cálcio, incluindo hidroxiapatita e seus substituintes, como fluorapatita e carbonato apatita. As soluções similares ao fluido corpóreo são misturas de sais inorgânicos presentes no plasma sanguíneo. Observando a formação de tecidos ósseos em organismos vertebrados, muitos materiais foram sintetizados através de processos biomiméticos em SBF a 37 °C, imitando a precipitação heterogênea de fosfatos de cálcio em substratos orgânicos, inorgânicos e metálicos (Holt, 1988; Resende, 2007). Esses processos biomiméticos têm sido utilizados para revestir implantes de ligas metálicas, acelerando a osteointegração após a cirurgia e diminuindo o tempo de recuperação dos pacientes (Kim, 2024; Shalini, 2023).

Os materiais biocompatíveis podem ser bioinertes ou bioativos; os bioinertes formam tecido fibroso após a implantação, enquanto os bioativos formam tecido ósseo na sua superfície (Platt, 2013). Para determinar se um material é bioativo, ele é submerso em SBF a 37 °C. O teste de bioatividade é similar aos processos de revestimento biomimético (Lobo, 2024).

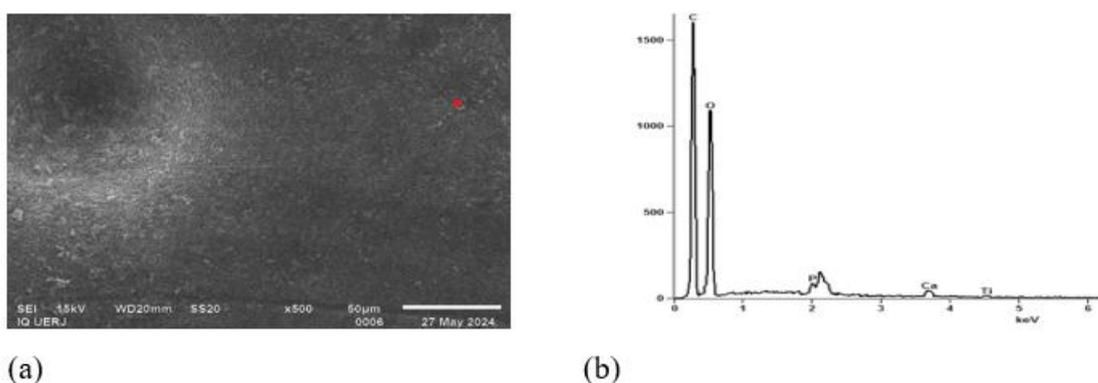
Existem diferentes formulações de soluções similares ao fluido corpóreo na literatura, variando em tipos de íons, concentrações e se são tamponadas ou não. Embora sejam frequentemente referidos como fluidos similares ao corpóreo devido à sua turbidez, todos esses fluidos contêm íons de cálcio e fosfato, permitindo a precipitação de fosfato de cálcio se o material for bioativo. Estudos indicam que, para formar fosfato de cálcio na superfície e avaliar a bioatividade dos materiais, é necessário que o fluido contenha apenas íons de cálcio e fósforo a 37 °C. Portanto, iniciou-se a utilização de fluidos simplificados (Holt, 1988; Kim, 2024; Lobo, 2024; Platt, 2013; Resende, 2007; Shalini, 2023). Neste estudo, foi utilizado um fluido simplificado preparado com fosfato de potássio e cloreto de cálcio para avaliar a bioatividade das membranas, ou seja, a formação de fosfato de cálcio na superfície das membranas.

Os testes biomiméticos, que envolvem a imersão das amostras no fluido simplificado a 37 °C por diferentes períodos, foram realizados em todas as composições das membranas sintetizadas, com 30 e 45 dias para caracterização por infravermelho. Apenas duas composições, B0/100–30 e B100/0–30, foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura acoplada com EDS após 18 dias de teste biomimético.

A fotomicrografia da membrana B0/100–30 é mostrada na Figura 16, onde o espectro

de EDS revela picos de baixa intensidade de cálcio e fósforo, correspondentes à imagem completa. Este resultado refere-se à imagem com ampliação de 500X, que tem maior representatividade. Não foram observados silício e titânio no espectro de EDS na superfície desta amostra, indicando que a camada de fosfato de cálcio formada não é suficientemente fina para permitir a detecção dos elementos constituintes da membrana. Antes da imersão no fluido simplificado, os elementos silício e titânio foram detectados nos espectros de EDS, conforme mostrado na Figura 12.

Figura 16 - Fotomicrografias das superfícies não ativas da membrana de acetato de celulose B0/100–30, 500X e EDS da imagem completa.

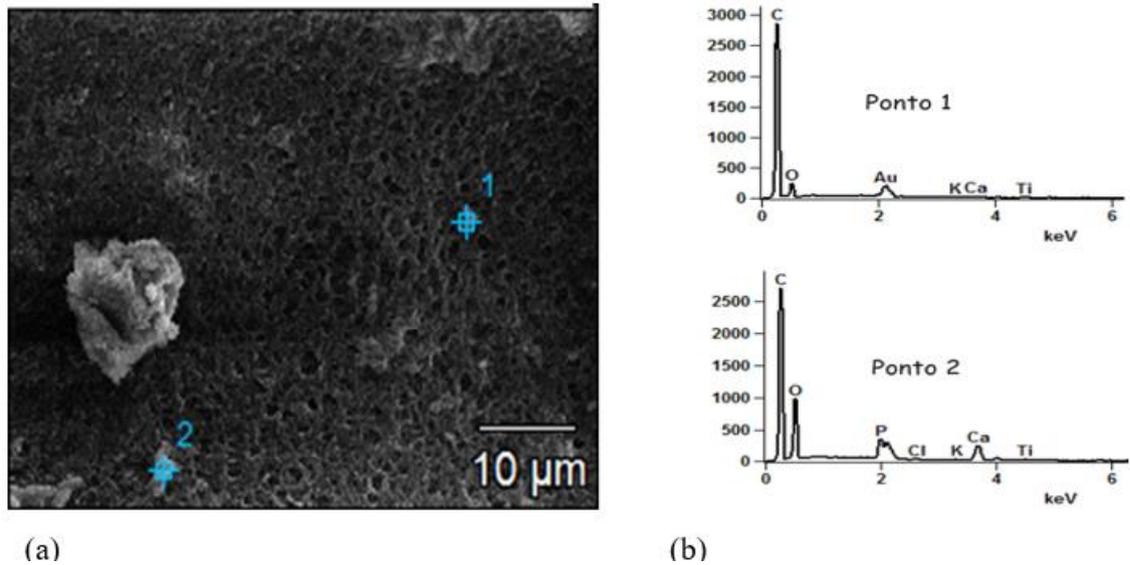


Legenda: (a) Fotomicrografias das superfícies não ativas da membrana de acetato de celulose B0/100-30, com 500X; (b) Espectro de EDS da imagem completa.

Fonte: A autora, 2024.

A Figura 17 apresenta os resultados pontuais da imagem da membrana B0/100–30, com ampliação de 2000X, confirmando a presença dos elementos cálcio e fósforo em apenas um ponto da superfície, indicando uma formação não uniforme do fosfato de cálcio. Apesar dessa não uniformidade, os resultados são promissores, pois mesmo em um curto período de teste biomimético, é possível observar indícios de bioatividade.

Figura 17 - Fotomicrografias da superfície não ativa da membrana de acetato de celulose B0/100–30, com 2000X e EDS pontual.

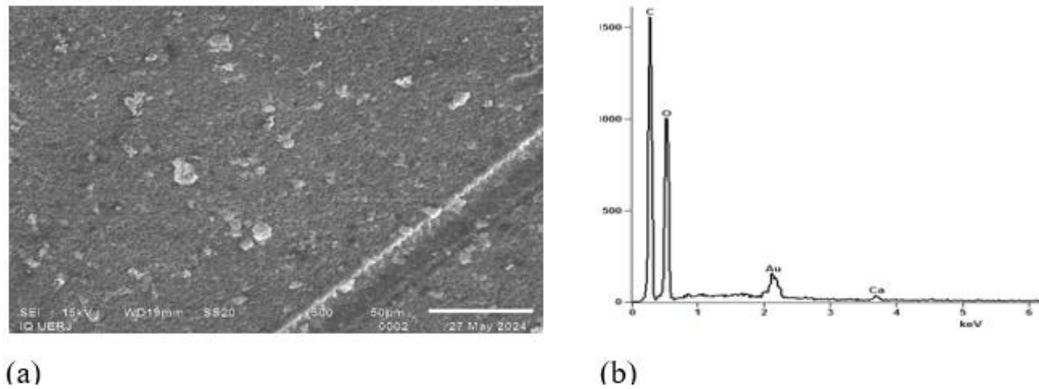


Legenda: (a) Fotomicrografia da superfície não ativa da membrana de acetato de celulose B0/100–30, com 2000X; (b) Espectro de EDS pontual.

Fonte: A autora, 2024.

A membrana contendo apenas TEOS e sem APTES, designada como B100/0–30, não apresentou picos de cálcio e fósforo no espectro de EDS da imagem completa, conforme a Figura 18. Além disso, os elementos silício e titânio também não foram detectados no espectro de energia dispersiva de raios X, o que sugere a possibilidade de problemas na análise, como variações de nível na superfície da amostra. Antes do teste biomimético, os elementos silício e titânio foram detectados, embora com intensidades pequenas, conforme mostrado na Figura 14.

Figura 18 - Fotomicrografia da superfície não ativa da membrana de acetato de celulose B100/0-30, com 500X e EDS da imagem completa.

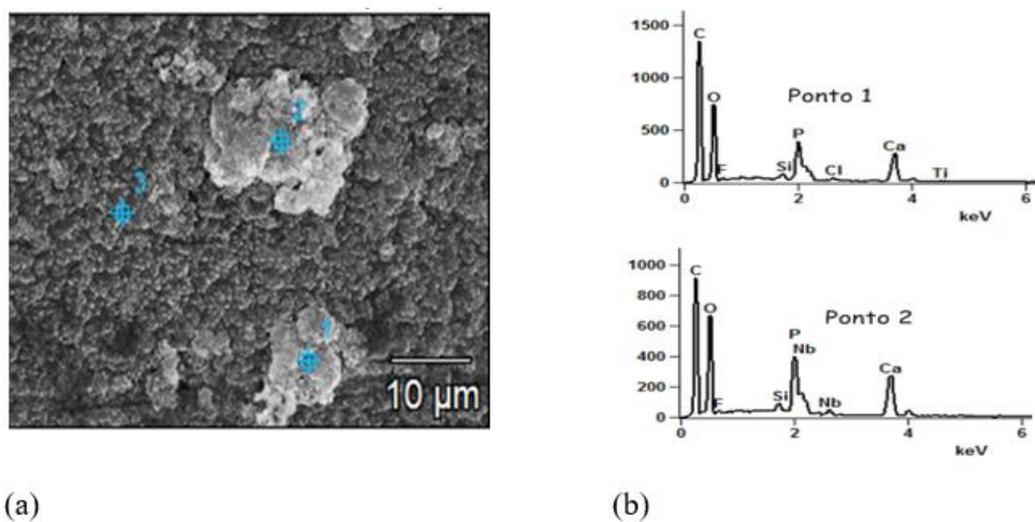


Legenda: (a) Fotomicrografia da superfície não ativa da membrana de acetato de celulose **B100/0 – 30**, com 500X; (b) Espectro de EDS da imagem toda.

Fonte: A autora, 2024.

A Figura 19 apresenta os resultados pontuais da imagem da membrana B100/0-30, com ampliação de 2000X, confirmando a presença dos elementos cálcio e fósforo na superfície desta membrana.

Figura 19 - Fotomicrografia da superfície não ativa da membrana de acetato de celulose B100/0-30, com 2000X e EDS pontual.

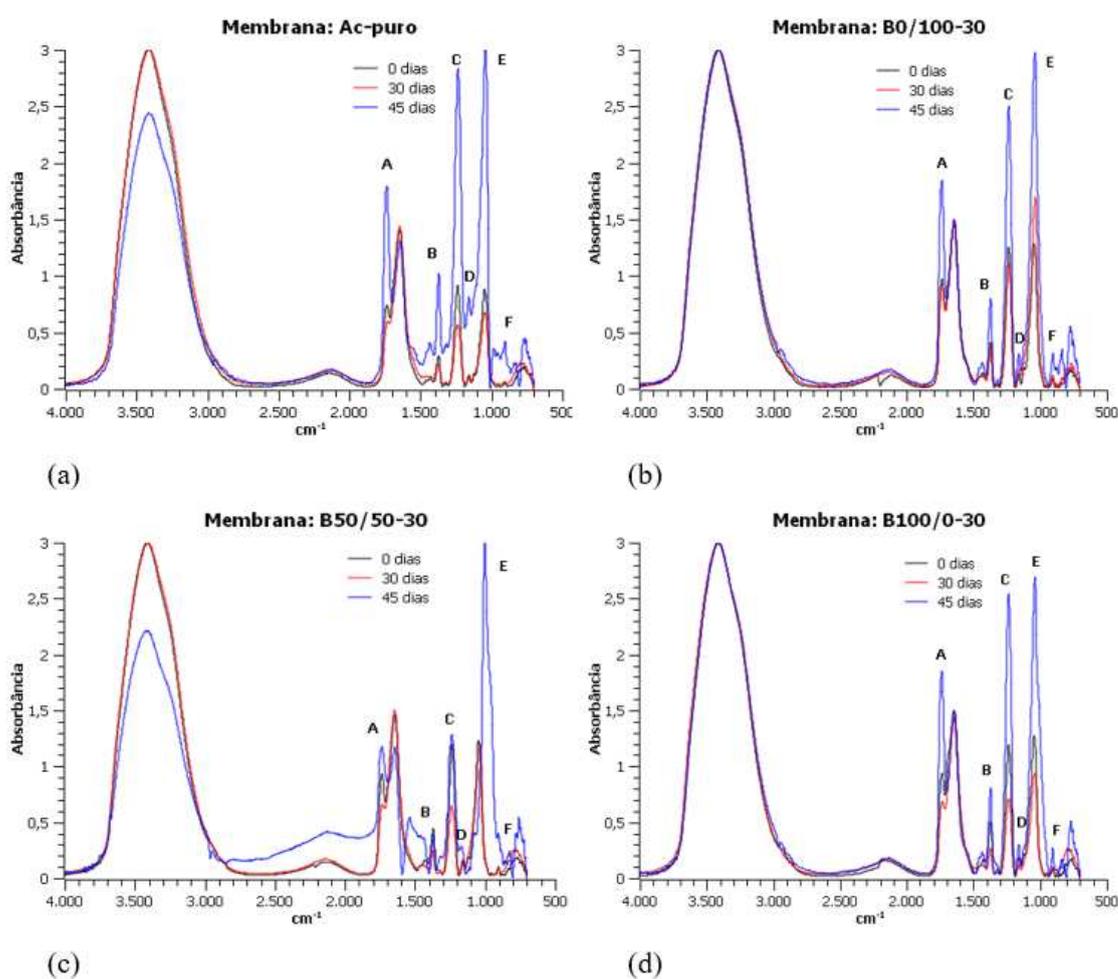


Legenda: (a) Fotomicrografia da superfície não ativa da membrana de acetato de celulose **B100/0-30**, com 2000X; (b) Espectro de EDS pontual.

Fonte: A autora, 2024.

Em todos os espectros de infravermelho das membranas sintetizadas, após 45 dias de testes biomiméticos, observa-se um aumento expressivo na intensidade de vários picos em diferentes números de onda, conforme mostrado pelos espectros de cor azul na Figura 20. Como não se espera nenhuma modificação química das membranas a 37 °C, acredita-se que esses aumentos são decorrentes da deposição de fosfatos de cálcio, que se sobrepõem aos picos das membranas de acetato de celulose.

Figura 20 - Comparação dos espectros de Infravermelho das quatro composições das membranas de acetato de celulose sintetizadas e imersas por 15, 30 e 45 dias em fluido simplificado na temperatura de 37 °C.



Software: Scidavis, v.2.4.0.

Fonte: A autora, 2024.

Ao avaliar os picos azuis dos espectros da Figura 20 em conjunto com a Tabela 5, constatamos que muitos desses picos estão associados a fosfatos de cálcio. A estrutura cristalina denominada hidroxiapatita é o fosfato de cálcio mais conhecido e possui a estrutura cristalina

mais estável. Quando se fala da parte mineral dos tecidos ósseos, geralmente refere-se à hidroxiapatita, embora outros fosfatos de cálcio possam estar presentes. Entre os diferentes tipos de fosfatos de cálcio, encontram-se o fosfato de cálcio amorfo (ACP), o fosfato octacálcico (OCP), os fosfatos tricálcicos (TCP), o pirofosfato de cálcio (CPP), a monetita (CaHPO_4) e a hidroxiapatita. Cada um destes possui diferentes razões de cálcio e fósforo.

Na estrutura da hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), podem ocorrer substituições nos grupamentos fosfato e hidroxila, formando variações como carboapatita e fluorapatita. Esses compostos desempenham diferentes funções no organismo e podem participar na formação e regeneração do tecido ósseo (Gomes et al., 2012).

Tabela 5 - Principais picos apresentados nos espectros de infravermelho da Figura 20.

Ponto	Posição das bandas cm^{-1}
A	1748
B	1365
C	1234
D	1170
E	1030
F	900

Fonte: A autora, 2024.

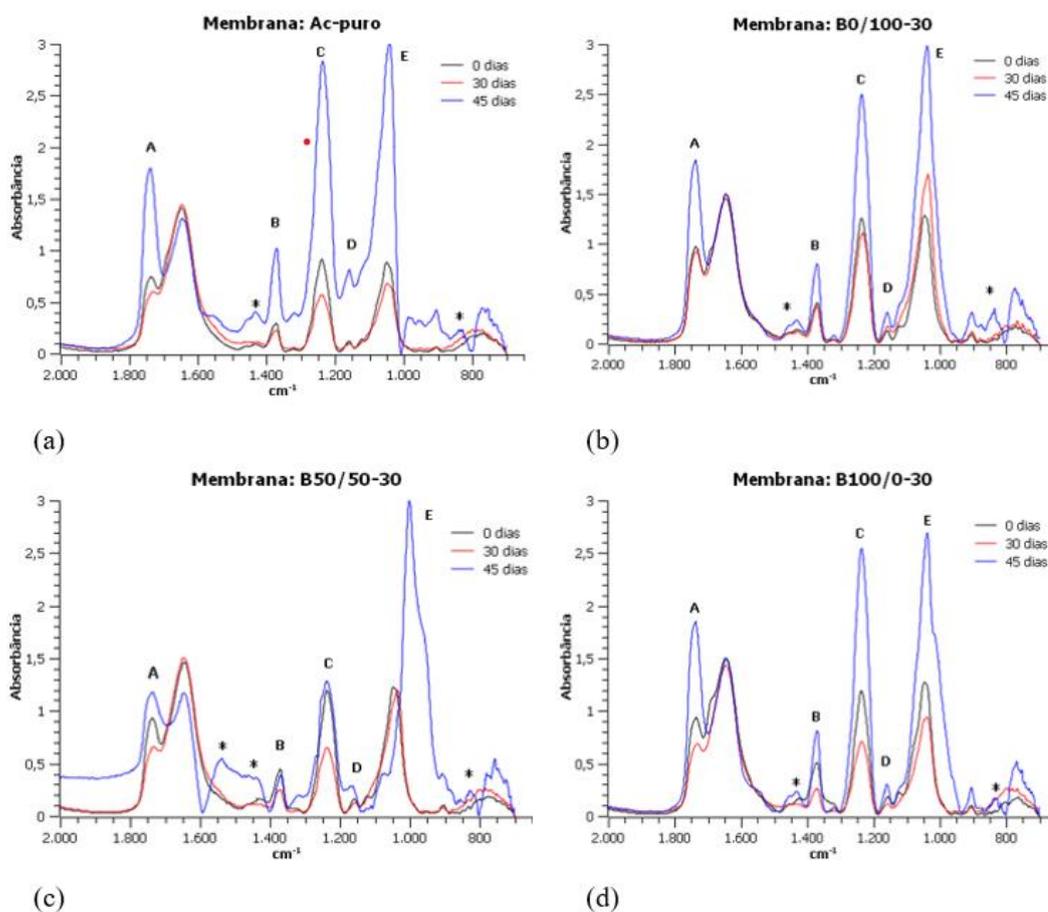
Ao avaliar os picos azuis dos espectros, constatamos muitos picos associados a fosfatos de cálcio. A hidroxila pode ser representada pelo pico em 1748 cm^{-1} , que geralmente aparece como um múltiplo, conforme mostrado na Figura 20. O pico em 1365 cm^{-1} pode ser atribuído à deformação assimétrica do grupamento P-CH₃, que está próximo ao valor de 1385 cm^{-1} relatado na literatura (Lobo, 2024). Este pico também pode ser atribuído ao grupamento carbonato. A carbonato apatita é representada por um pico largo entre 1390 e 1515 cm^{-1} , observado na amostra B50/50-30, além do pico em 1433 cm^{-1} , que aparece com pouca intensidade nas outras amostras, e do pico em 842 cm^{-1} , bem definido em todas as amostras. Uma banda claramente resolvida em aproximadamente 1234 cm^{-1} , correspondente à deformação P—O—H, sobrepõe-se à região de alongamento dos fosfatos (Holt, 1988). Os picos em 1170 e 1030 cm^{-1} podem estar relacionados ao grupamento P-O da monetita, sendo encontrados picos em 1157 e 1023 cm^{-1} por Lobo, 2024. Além disso, o pico em 1030 cm^{-1} é

característico do alongamento assimétrico do grupamento de fosfato, PO_4^{3-} .

Diante destes dados, é bem provável que tenhamos carbonato apatita na superfície das membranas. Este argumento é reforçado pela facilidade de formação de carbonato apatita, um dos fosfatos de cálcio que participa do início da regeneração óssea ou da formação dos tecidos ósseos. Assim, após 45 dias, a superfície das membranas contém fosfato de cálcio, confirmando a obtenção de um material bioativo.

A Figura 21 mostra os pontos em aproximadamente 1440 e 850 cm^{-1} , além da banda larga entre 1533 e 1437 cm^{-1} , na amostra B50/50-30; todos esses são característicos do carbonato, indicando a formação de carboapatita. Na formação do tecido ósseo, a carboapatita é a estrutura precursora. Por isso, é importante enfatizar esses picos pouco intensos, mas característicos da carboapatita, indicando que o material é realmente bioativo e pode ser utilizado para acelerar a osteointegração.

Figura 21 - Restrição de 2000 a 700 cm^{-1} dos espectros de Infravermelho, da Figura 20, das quatro composições das membranas de acetato de celulose sintetizadas e imersas por 15, 30 e 45 dias em fluido simplificado na temperatura de 37 °C.



Fonte: A autora.

Software: Scidavis, v.2.4.0.

4 DISCUSSÃO GERAL

As caracterizações da viabilidade celular e da bioatividade das membranas sintetizadas nesta dissertação representam um avanço significativo nos trabalhos do grupo de pesquisa. A confirmação da não toxicidade e das propriedades bioativas das membranas permite direcionar as pesquisas para aplicações na área da saúde. As membranas de acetato de celulose são conhecidas por sua alta flexibilidade, tenacidade, resistência química, resistência mecânica e alta solubilidade em solventes orgânicos. Agora, com a adição das características de bioatividade e não toxicidade, estas membranas podem ser avaliadas para promover a interação entre a estrutura e as células, facilitando a regeneração e o crescimento celular.

Materiais bioativos induzem a osteocondutividade e a osteointegração, acelerando os processos de regeneração óssea na engenharia de tecidos ósseos. A capacidade das membranas de acetato de celulose de suportar esses processos, aliada às suas propriedades físicas e químicas favoráveis, as tornam candidatas promissoras para aplicações biomédicas, especialmente em implantes e dispositivos para a regeneração de tecidos. A pesquisa futura pode explorar mais detalhadamente os mecanismos pelos quais essas membranas interagem com as células e tecidos, além de otimizar suas propriedades para aplicações específicas na medicina regenerativa.

CONCLUSÃO

As composições das membranas sintetizadas neste trabalho apresentaram espectros de infravermelho similares aos obtidos em estudos anteriores do grupo de pesquisa, bem como aos descritos por outros autores na literatura. Observou-se variação na cor e na textura entre as membranas, sugerindo possíveis diferenças na composição superficial ou nas condições de síntese. Nas análises termogravimétricas, todas as membranas exibiram três eventos de decomposição, ocorrendo em faixas de temperatura semelhantes. A membrana com composição pura e sem TEOS, identificada como B0/100-30, destacou-se por apresentar maior variação de entalpia na etapa de degradação da celulose, o que sugere uma maior estabilidade térmica.

Adicionalmente, a membrana pura exibiu variações de contraste na superfície não ativa, porém os espectros de EDS pontuais não revelaram variações significativas. Já na composição sem TEOS (B0/100-30), foi detectado um teor mais elevado de silício, conforme apontado pelas análises de EDS. Todas as membranas sintetizadas demonstraram viabilidade celular acima de 70%, o que indica ausência de potencial citotóxico. Após 45 dias de testes biomiméticos, todas as membranas apresentaram picos característicos de grupamentos funcionais de fosfatos e carboapatita.

Duas composições, B0/100-30 e B100/0-30, mostraram picos de fosfato e carboapatita já após 18 dias de teste biomimético, reforçando suas propriedades bioativas. Assim, todas as composições de membranas sintetizadas foram confirmadas como bioativas e não citotóxicas, destacando seu potencial promissor para aplicações na área da saúde, com especial relevância para regeneração óssea e engenharia de tecidos.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. C. et al. Improving hydraulic permeability, mechanical properties and chemical functionality of cellulose acetate-based membranes by copolymerization with tetraethyl orthosilicate and 3-(aminopropyl) triethoxysilane. **Carbohydrate Polymers**, v. 261, p. 1-14, 2021.
- BARBOSA, I. T. F. **Liberação controlada de bioativos suportados por nanopartículas de pseudoboemita obtidas pelo processo sol-gel**. 2019.209f. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais e Nanotecnologia). Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2019.
- BORGES, M. F. **Desenvolvimento de membranas de acetato de celulose incorporadas com aditivos funcionais para tratamentos regenerativos periodontais**, 94 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, 2018.
- CERQUEIRA, D. A. et al. Caracterização de acetato de celulose obtido a partir do bagaço de cana-de-açúcar por ¹H-RMN. **Polímeros**, v. 20, p. 85-91, 2010.
- CIMÕES, R. **Manual Prático para Cirurgia Periodontal e Periimplantar**. São Paulo: **Napoleão**, 2013.
- CIOLACU, D.; CIOLACU, F.; POPA, V. I. Amorphous cellulose—structure and characterization. **Cellulose chemistry and technology**, v. 45, n. 1, p. 13, 2011.
- DANKS, A. E.; HALL, S. R.; SCHNEPP, Z. J. M. H. The evolution of ‘sol–gel’ chemistry as a technique for materials synthesis. **Materials Horizons**, v. 3, n. 2, p. 91-112, 2016.
- DAS, P. P. et al. Advancement in hybrid materials, its applications and future challenges: A review. **Materials Today: Proceedings**, vol 47, 2021, 3794–3801.
- DONATTI, D. A. **Estudo do processo sol-gel para a obtenção de xerogéis e aerogéis monolíticos**. 2003. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.
- DOURADO, M.; BITTENCOURT, S.; TUNES, U. da R. **Avanços em Periodontia e Implantodontia - Paradigmas e desafios**. São Paulo: **Quintessence**, 2011. 740 p.
- FARIA, M. et al. Hybrid flat sheet cellulose acetate/silicon dioxide ultrafiltration membranes for uremic blood purification. **Cellulose**, v. 27, p. 3847-3869, 2020.
- FELLER, R. L.; WILT, M. **Evaluation of Cellulose Ethers for Conservation**. **Research in Conservation**. The Getty Conservation Institute, USA, 1990
- FERREIRA, G. R. **Híbridos Orgânicos-Inorgânicos a Partir de Íons Metálicos**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 2014.
- FERREIRA, G. M. **Produção e caracterização de membranas de acetato de celulose híbridas**. 2022. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto Politécnico, Nova Friburgo.

FERREIRA, G. M. et al. Avaliação da Cinética de Degradação Térmica de Membranas de Acetato de Celulose Híbridas usando Métodos Isoconversionais. **VETOR - Revista De Ciências Exatas E Engenharias**, v. 32, n.1, p. 52–61, 2022.

FERREIRA, G. M. et al. Síntese de Membranas de Acetato de Celulose Híbridas e Aplicação do Método Isoconversional de Flynn-Wall-Ozawa. **VETOR - Revista De Ciências Exatas E Engenharias**, v. 33, n. 1, p. 69–79, 2023.

FERREIRA, J. A. **Desenvolvimento de membranas de acetato de celulose incorporadas com aditivos funcionais para uso em Odontologia**. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Uberlândia.

FERREIRA, M. V. et al. Avaliação do perfil de liberação do fármaco ibuprofeno em membranas simétricas e assimétricas de acetato de celulose: efeito da morfologia. **Química Nova**, v. 42, p. 823-830, 2019.

GRAZIANI, V., FEITOSA, S. A.; PEREIRA, M. M. Sol-gel synthesis of bioactive glass nanoparticles and their applications in biomedical fields. **Ceram Int**. 2020.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de separação por membranas**. Editora e-papers, 2006.

HOLT, C. et al. Preparation of amorphous calcium-magnesium phosphates at pH 7 and characterization by X-ray absorption and Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Crystal Growth**, v. 92, 239 - 252, 1988.

ISOPPO, V. G. **Síntese e caracterização fotofísica de materiais híbridos orgânico-inorgânicos fluorescentes contendo benzotriazolinas**. 2022. 226f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Porto Alegre.

KIM, J. Y. et al. Development of cell-laden photopolymerized constructs with bioactive amorphous calcium magnesium phosphate for bone tissue regeneration via 3D bioprinting. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 267, p. 131412, 2024.

KLAAI, L. et al. Thermal and structural analyses of extracted cellulose from olive husk. **Materials Today: Proceedings**, 52, 104–107, 2022.

KOOPMANN, A. et al. Tannin-Based Hybrid Materials and Their Applications: A Review. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 4910, 2020.

LANDRY, C. J. T. et al. In situ polymerization of tetraethoxysilane in polymers: chemical nature of the interactions. **Polymer**, v. 33, n. 7, p. 1496-1506, 1992.

LIN, Q. et al. Mechanism analysis of thermal treatment for the mechanical properties of bamboo veneer composites from the perspective of cellulose skeleton. **Industrial Crops & Products**, 195, 2023.

LOBO, C. C. et al. Synthesis and characterization of functional calcium-phosphate-chitosan adsorbents for fluoride removal from water. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 264, p. 130553, 2024.

LOTUFO, R. **Periodontia e Implantodontia - Desmistificando a Ciência**. 1ª ed. São Paulo: Napoleão, 2003.

MARINI, M. et al. Preparation and antibacterial activity of hybrid materials containing quaternary ammonium salts via sol–gel process. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 8, p. 3621-3628, 2007.

MCNEILL, I. C. Fundamental aspects of polymer degradation. **Polymers in conservation**, p. 14-31, 1992.

MEDEIROS, K. M. *et al.* Membranas microporosas híbridas assimétricas: influência da argila na morfologia das membranas. **Matéria**, v. 22, pág. 1-13, 2017.

MEIRELES, C. da S. **Síntese e caracterização de membranas de acetato de celulose, obtido do bagaço de cana-de-açúcar, e blendas de acetato de celulose com poliestireno de copos plásticos descartados**. 2007. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de Uberlândia.

MENDES, G. et al. Structure of water in hybrid cellulose acetate-silica ultrafiltration membranes and permeation properties. **Carbohydrate polymers**, v. 189, p. 342-351, 2018.

NAIR, P. A. K. et al. Uma revisão sobre as aplicações da ciência sol-gel em cimento. **Construção e materiais de construção**, v. 291, p. 123065, 2021.

NASCIMENTO, G. L. T. **Filmes Finos Anti-Refletores de Sílica Preparados pelo Processo Sol-Gel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.

OWENS, G. J. et al. Sol–gel-based materials for biomedical applications. **Progress in materials science**, v. 77, p. 1-79, 2016.

PANDEY, S.; MISHRA, S. B. Sol–gel derived organic–inorganic hybrid materials: synthesis, characterizations and applications. **Journal of sol-gel science and technology**, v. 59, p. 73-94, 2011.

PEDROZA, R. C. **Espectroscopia Raman em Nanocompósitos de CoFe₂O₄/SiO₂ Preparados pelo Método Sol-Gel**. Instituto de Física, Universidade de Brasília, 2007.

PEIXOTO, I.; FARIA, M.; GONÇALVES, M. C. Synthesis and Characterization of Novel Integral Asymmetric Monophasic Cellulose–Acetate/Silica/Titania and Cellulose–Acetate/Titania Membranes. **Membranes** 2020, **10**, **195**, p. 1-26, 2020.

PLATT, G. M. et al. Thermodynamic Simulation of Phosphate Precipitation based on Ion-Selective Microelectrode Measurements. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 24, n. 6, 1064-1071, 2013.

RESENDE, C. X. et al. Estudo teórico e experimental da solução avaliadora de bioatividade (SBA). **Revista Matéria**, v. 12, n. 2, p. 358-366, 2007

RIBEIRO, E. A. M. **Síntese, Caracterização e Aplicação de Membranas de Acetato de Celulose a partir da Reciclagem da Palha de Milho em Processos de Ultrafiltração**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, Minas Gerais, 2013.

RIGOLETTO, M. et al. Materiais híbridos para a remoção de poluentes emergentes na água: Classificação, síntese e propriedades. **Chemical Engineering Journal Advances**, v. 10, p. 100252, 2022.

SHALINI, T. et al. Unravelling the nature-inspired silk sericin - Calcium phosphate hybrid nanocomposites: A promising sustainable biomaterial for hard tissue regeneration applications. **Surfaces and Interfaces**, v. 42, p. 103396, 2023.

SHASHOUA, Y. Conservation of Plastics - Materials Science, Degradation and Preservation. Oxford: **Butterworth-Heinemann**, 2008.

SIEVERS, N. V. **Síntese in situ de TiO₂ nanoestruturado em solução de PP para produção de filmes fotodegradáveis e antibacterianos**. 2020. 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SILVA, F. M. S. et al. Membranas absorvíveis x não-absorvíveis na implantodontia: revisão da literatura. **Rev. cir. traumatol. buco-maxilo-fac**, p. 19-24, 2005. Universidade Estadual Paulista - UNESP - Campus Rio Claro.

SOLOVIEV, A. et al. Aggregation kinetics of sol-gel process based on titanium tetraisopropoxide. **Journal of materials science**, v. 38, p. 3315-3318, 2003.

SUBRAMANIAN, K.; VIJAYAKUMAR, V.; Thermal analysis of cellulosic stalk (stem) fiber from the ornamental Allamanda Blanchetii plant for commercial exploitations. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, 2021.

YAMAURA, M. et al. Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. **Journal of magnetism and magnetic materials**, v. 279, n. 2-3, p. 210-217, 2004.

ZAROOR, A.; ABU-REZIQ, R. Poly(ethylene glycol) Silica hybrid microparticles prepared via a non-aqueous sol-gel process: A method for merging both classes of hybrid materials. **Materialia**, vol 9, 2020.

ZHENG, K.; BOCCACCINI, A. R. Processamento sol-gel de nanopartículas bioativas de vidro: uma revisão. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 249, p. 363-373, 2017.