

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIODIVERSIDADE

NANOCOMPÓSITOS BIOCMPATÍVEIS DE
POLIURETANA COM HIDROXIAPATITA E
NANOCELULOSE

Thaís Moraes Arantes

Orientador: Prof. Dr. Luciano Morais Lião

Goiânia

2018

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Thaís Moraes Arantes

Título do trabalho: Nanocompósitos Biocompatíveis de Poliuretana Com Hidroxiapatita e Nanocelulose

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Thaís Moraes Arantes



Prof. Dr. Luciano Morais Lião

Data: 10/05/2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Thaís Moraes Arantes

**Nanocompósitos Biocompatíveis de Poliuretana Com
Hidroxiapatita e Nanocelulose**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Federal de Goiás como critério para obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Morais Lião

Goiânia, março de 2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Moraes Arantes, Thaís
Nanocompósitos Biocompatíveis de Poliuretana Com Hidroxiapatita e Nanocelulose [manuscrito] / Thaís Moraes Arantes. - 2018.
153 f.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Morais Lião ; co-orientadora Dra. Glaucia Braz Alcantara.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Pró-reitoria de Pós-graduação (PRPG), Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Goiânia, 2018.

1. Poliuretana. 2. Nanocelulose. 3. Hidroxiapatita. I. Morais Lião , Luciano, orient. II. Título.

CDU 60



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIODIVERSIDADE
Rua 235, S/N - Setor Universitário - Goiânia/GO CEP 74605-050
Fone (62) 3209.6362
email: pgbb.goias@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE THAÍS MORAES ARANTES - Aos dois dias do mês de abril do ano de 2018 (02/04/2018), às 13:30 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. LUCIANO MORAES LIÃO, EMERSON RODRIGUES DE CAMARGO, DENILSON RABELO, EMILIA LIMA DE OLIVEIRA e CARLOS FREDERICO DE SOUZA CASTRO, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: "SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS DE POLIURETANA COM NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA E NANOCELULOSE", em nível de DOUTORADO, área de concentração em BIOTECNOLOGIA, de autoria de THAÍS MORAES ARANTES, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo orientador do discente, Prof. Dr. LUCIANO MORAES LIÃO, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida à autora da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução n.º 1181/2013 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luciano Moraes Lião
Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo
Prof. Dr. Denilson Rabelo
Prof. Dra. Emilia Lima de Oliveira
Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro

Aprovada / Reprovada

Aprovada
APROVADA
APROVADA
APROVADA
APROVADA

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Habilitada (Habilitada ou não **Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE, na área de concentração em BIOTECNOLOGIA, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 18h30min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, ZHARA HELOU RIBEIRO DE CASTILHO, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.
A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Nanocompósitos biocompatíveis de poliuretana com hidroxiapatita e nanocelulose

Prof. Dr. Luciano Moraes Lião (IQ/UFG) _____

Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo (UFSCAR) _____

Prof. Dr. Denilson Rabelo (IQ/UFG) _____

Prof. Dra. Emilia Lima de Oliveira (IQ/UFG) _____

Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro (IFGoiano) _____

Secretário da Pós-Graduação: _____

Zhara Helou Ribeiro de Castilho

*“Um especialista é aquele que comete todos os erros que podem
ser cometidos em um campo muito restrito”*

NIELS BOHR

*Ao meu filho Daniel e ao meu esposo Gabriel,
pelo amor, carinho, paciência e compreensão,
dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

- A Universidade de Federal de Goiás e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade pela oportunidade.
- Ao Prof. Dr. Luciano Morais Lião, por transmitir seus conhecimentos e pela confiança que foi demonstrada durante o período de realização deste trabalho.
- Ao IF Goiano pelo apoio financeiro.
- A Usina Decal de Rio Verde, Goiás, que gentilmente cedeu o bagaço de cana-de-açúcar utilizado.
- Ao Laboratório de Microscopia da UFG pelas análises de Microscopias (MEV e MET) realizadas.
- Ao Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação - CRTI pelas análises de Infravermelho, Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TGA).
- Ao LIEC – Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica do Departamento de Química da UFSCar pelas medidas de espectroscopia Raman e de Difração de raios X
- Ao Instituto de Ciência e Tecnologia da UNIFESP São José dos Campos pelas medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e Potencial Zeta e pelos ensaios de Termogravimetria (TGA).
- A Usina Decala de Rio Verd - GO que gentilmente cedeu o bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho.
- A Prof^a. Dra Dayane Batista Tada do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNIFESP São José dos Campos pelos ensaios de viabilidade celular.
- Ao Gabriel Marques Rosa, meu esposo, pela compreensão nas horas de ausência, pela paciência nas horas de desespero e por todo amor e carinho demonstrado. Também agradeço pelo apoio intelectual e grande ajuda nesta longa caminhada.
- A Tatiane Moraes Arantes, minha irmã, que nesta caminhada atuou indiretamente como minha co-orientadora, me ajudando a encontrar soluções para os muitos problemas encontrados nessa caminhada de 4 anos.

- Ao Fernando Henrique Cristovan, meu cunhado, pela grande ajuda em todos os assuntos relacionados à tese e principalmente a quimiometria.
- Aos meus pais, Vanda e Laerte, pelo incentivo e apoio até a última etapa da minha grande caminhada em direção ao conhecimento, sempre afirmando que a única herança que poderiam deixar para os filhos era o estudo.
- Ao meu irmão Laércio, aos meus sobrinhos Laerte Neto, Henrique e Emanuel pelo amor e carinho que me impulsionam.
- Aos meus alunos de iniciação científica que contribuíram para esse trabalho: Lilian, Flávia, Joyce, Aline e André.
- A todos os amigos e colegas que conheci e que direta ou indiretamente me auxiliaram durante este trabalho. Pela amizade e pelos momentos de descontração dentro e fora do local de trabalho.
- Aos membros da banca examinadora pelas contribuições durante a defesa.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho,

Muito obrigada!

Resumo:

Foram preparados nanocompósitos de poliuretana com nanopartículas de hidroxiapatita e/ou nanocelulose buscando obter materiais biocompatíveis. As nanoceluloses foram obtidas do bagaço de cana-de-açúcar, buscando avaliar a sua utilização como fonte de nanofibras de celulose. Foram investigadas as condições de extração e separação das nanoceluloses. Estudou-se o efeito do tempo e da concentração de ácido sulfúrico, que resultassem em partículas com tamanho reduzido e homogeneidade na distribuição de tamanho, sem que houvesse degradação da celulose. Os nanocristais de celulose que apresentaram os melhores resultados quanto à coloração da suspensão, índice de cristalinidade, propriedades térmicas, dimensão das partículas e potencial Zeta foram aqueles hidrolisados em H₂SO₄ 50%, a 45 °C por 2 horas. Para a síntese das nanopartículas de hidroxiapatita (HA) foi realizada uma análise estatística multivariada usando um planejamento fatorial com resolução 2³. A partir do qual se criou um modelo empírico que permite o controle da forma e tamanho das nanopartículas de hidroxiapatita. Foram sintetizadas nanopartículas de HA com tamanhos variando entre 8 nm e 600 nm, formados por mecanismo de crescimento por coalescência orientada. A estrutura foi confirmada por imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microscopia Eletrônica de Varredura. As nanopartículas de hidroxiapatita apresentaram formato de *nanorod* bem definidas e com estreita distribuição de tamanho. Observou-se que o modelo foi estatisticamente significativo e o parâmetro principal para o crescimento de cristais no processo hidrotérmico foi a temperatura. Poliuretanas derivadas do óleo de mamona foram sintetizadas sem resíduos de seus monômeros. A inserção das nanopartículas na matriz polimérica melhorou a estabilidade térmica do compósito. Por fim, o ensaio de viabilidade celular mostrou que nanocompósitos de poliuretana com hidroxiapatita são biocompatíveis e desta forma podem ser utilizados como biomaterial.

Palavras chaves: Biomaterial, poliuretana, bagaço de cana-de-açúcar, nanocelulose, hidroxiapatita, hidrotérmico.

Abstract:

Polyurethane nanocomposites were prepared with nanoparticles of hydroxyapatite and/or nanocellulose in order to obtain biocompatible materials. The nanocelluloses were obtained from sugarcane bagasse, seeking to evaluate their use as a source of cellulose nanofibers. The conditions of extraction and separation of the nanocelluloses were investigated. The effect of time and concentration of sulfuric acid was studied, resulting in particles with reduced size and homogeneity in the size distribution without cellulose degradation. The cellulose nanocrystals that presented the best results regarding suspension staining, crystallinity index, thermal properties, particle size and Zeta potential were those hydrolyzed in 50% H₂SO₄ at 45 ° C for 2 hours. For the synthesis of the hydroxyapatite (HA) nanoparticles, a multivariate statistical analysis was carried out using a factorial design with resolution 2³. From which an empirical model was created that allows the control of the shape and size of the hydroxyapatite nanoparticles. HA nanoparticles with sizes varying from 8 nm to 600 nm were formed by oriented coalescence growth mechanism. The structure was confirmed by images of Electron Transmission Electron Microscopy and Scanning Electron Microscopy. The hydroxyapatite nanoparticles presented a well-defined nanorod shape with a narrow size distribution. It was observed that the model was statistically significant and the main parameter for the growth of crystals in the hydrothermal process was the temperature. Polyurethanes derived from castor oil were synthesized without residues of their monomers. The insertion of the nanoparticles into the polymer matrix improved the thermal stability of the composite. Finally, the cell viability assay showed that polyurethane nanocomposites with hydroxyapatite are biocompatible and in this way can be used as biomaterial.

Keywords: Biomaterial, polyurethane, sugarcane bagasse, nanocellulose, hydroxyapatite, hydrothermal.

SUMÁRIO

1- Introdução.....	23
2- Revisão Bibliográfica.....	25
2.1- Biomassa.....	25
2.2- Cana-de-açúcar	26
2.2.1- Bagaço de cana-de-açúcar	28
2.2.1.1 - Composição química do Bagaço de Cana-de-açúcar	30
2.2.1.2- Polioses (Hemicelulose).....	30
2.2.1.3- Lignina.....	31
2.2.1.4- Celulose	33
2.2.1.4.1- Nanoceluloses	37
3- Objetivos.....	40
4- Materiais e Métodos	40
4.1- Desmedulamento do bagaço de cana-de-açúcar	40
4.2- Composição química da fração fibra bagaço de cana-de-açúcar	41
4.2.1- Teor de umidade	41
4.2.2- Teor de extrativos solúveis em cicloexano/etanol	41
4.2.3- Teor de cinzas.....	41
4.2.4- Teor de lignina Klason insolúvel	42
4.2.5- Teor de lignina Klason solúvel	42
4.2.6- Obtenção da holocelulose.....	43
4.3- Polpação da fibra do bagaço de cana-de-açúcar	43
4.4- Preparação das nanoceluloses a partir do bagaço de cana.....	44
4.5- Caracterizações.....	45
4.5.1- Espectroscopia no Infravermelho das nanoceluloses (IV).....	45
4.5.2- Análise de Difração de Raios X das nanoceluloses (DRX)	46
4.5.3- Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e Potencial Zeta	46
4.5.4- Análise Termogravimétrica (TGA).....	46
4.5.5- Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	47
4.5.6- Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	47
5- Resultados e Discussão	47
5.1- Desmedulamento do bagaço de cana-de-açúcar	47
5.2- Composição Química do Bagaço de Cana-de-açúcar	48
5.3- Rendimento da polpação da fibra do bagaço de cana-de-açúcar	49
5.4. Estudo exploratório para obtenção dos nanocristais de celulose.....	50
5.5. Obtenção e caracterização de nanocristais de celulose da fibra do bagaço de cana-de-açúcar	51

5.4.1- Espectroscopia no Infravermelho das nanoceluloses (IV).....	52
5.4.2- Distribuição do tamanho das nanoceluloses obtidas.....	55
5.4.3- Potencial Zeta das suspensões de nanoceluloses.....	58
5.4.4- Difração de Raios X da fibra purificada e das nanoceluloses.....	59
5.4.6- Caracterização morfológica das nanoceluloses.....	65
6- Conclusão Parcial.....	71
7- Referências.....	72
Parte B: Síntese Hidrotérmica de Nanopartículas de Hidroxiapatita Coloidal.....	
1. Introdução.....	81
2- Revisão Bibliográfica.....	83
2.1- Materiais Cerâmicos.....	83
2.1.1- Biocerâmicas.....	83
2.1.1.1. Hidroxiapatita (HA).....	84
2.2. Nanomateriais.....	85
2.2.1. Síntese de Nanopartículas.....	86
2.2.1.1. Síntese de Nanopartículas de Hidroxiapatita.....	87
3- Objetivos.....	88
4- Materiais e Métodos.....	88
4.1- Síntese de nanopartículas de hidroxiapatita.....	88
4.2- Caracterizações das nanopartículas de Hidroxiapatita.....	90
4.2.1- Difração de Raios X.....	90
4.2.2- Espectroscopia de Raman.....	91
4.2.3- Espectroscopia no Infravermelho (IV).....	91
4.2.4- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	91
4.2.5- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	91
5- Resultados e Discussão.....	92
5.1- Obtenção e caracterização de nanopartículas de hidroxiapatita.....	92
5.1.1- Difração de Raios X (DRX) das nanopartículas de hidroxiapatita.....	92
5.1.2- Espectroscopia Ramam das nanopartículas de hidroxiapatita.....	94
5.1.3- Espectroscopia no Infravermelho das hidroxiapatitas (IV).....	96
5.1.4- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	97
5.1.5- Planejamento fatorial 2 ³ da síntese hidrotérmica de nanopartículas de hidroxiapatita.....	101
6. Conclusão Parcial.....	107
7- Referencias.....	107

Parte C: Síntese e Caracterização de Nanocompósitos de Poliuretana com Nanopartículas de Hidroxiapatita e Nanocelulose	113
1- Introdução.....	113
2- Referencial Teórico.....	114
2.1- Polímeros	114
2.1.1- Poliuretanas (PU)	115
2.1.2.1- Isocianatos	118
2.1.2.2- Polióis.....	119
2.1.2.2.1- Óleo de mamona	120
2.2- Nanocompósitos Poliméricos.....	121
3- Objetivos.....	123
4. Materiais e Métodos	123
4.1- Síntese de polioliol derivado do óleo de mamona.....	123
4.2- Síntese das poliuretanas e nanocompósitos	123
4.3- Caracterizações dos nanocompósitos poliméricos.....	124
4.3.1- Espectroscopia no Infravermelho (IV) dos Polímeros	124
4.3.2- Calorimetria Diferencial de Varredura.....	125
4.3.3- Análise Termogravimétrica (TGA) dos Polímeros	125
4.3.4- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos Polímeros	125
4.3.5- Ensaios de viabilidade celular	125
4.3.5.1- Cultivo Celular	125
4.3.5.2- Teste de proliferação celular	126
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	127
5.1- Caracterização dos polímeros puros e dos nanocompósitos de poliuretana	129
5.1.1- Espectroscopia no Infravermelho	129
5.1.2- Análise térmica dos polímeros e nanocompósitos.....	131
5.1.2.1- Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	131
5.1.2.2- Análise Termogravimétrica (TGA)	134
5.2- Caracterização morfológica dos polímeros e nanocompósitos por microscopia eletrônica de varredura	136
5.3- Ensaios de viabilidade celular.....	141
6- Conclusão Parcial	143
7- Referências.....	144
Considerações Finais	151

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>).....	27
Figura 2. Bagaço integral (M.O. 425x).....	29
Figura 3. Açúcares que compõem as unidades de polioses.	31
Figura 4. Precursores primários da lignina.	32
Figura 5. Modelo de lignina de faia, proposto por NIMZ (1974).	33
Figura 6. Unidade de celobiose.....	34
Figura 7. Esquema da estruturação das fibras da celulose.....	35
Figura 8. Projeção axial da estrutura da celulose tipo I. $a = 16,34 \text{ \AA}$; $b = 15,72 \text{ \AA}$; $C = 10,38 \text{ \AA}$	36
Figura 9. Micrografias eletrônicas de transmissão de a) CMF; b) CNC; c) micrografia eletrônica de varredura do NCB. (Fonte: KLEMM <i>et al.</i> , 2011)	39
Figura 10. Fração rica em medula (A); fração rica em fibra (B).....	48
Figura 11. Fibra do bagaço de cana triturada 35 Mesh (A); B: Celulose obtida da fibra do bagaço de cana após branqueamento com clorito.	50
Figura 12. Imagens de MEV da amostra de celulose submetida à condição de 6 mol L^{-1} , temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ e 180 min.	51
Figura 13. Imagens de MEV da amostra de celulose submetida a condição de $9,2 \text{ mol.L}^{-1}$, temperatura ambiente e 75 min.	51
Figura 14. Fotos das nanoceluloses (NC) obtidas liofilizadas.	52
Figura 15. Espectros no infravermelho da fração fibra do bagaço de cana-de-açúcar e da celulose, obtidas neste trabalho.....	53
Figura 16. Espectros no infravermelho relativos às nanoceluloses (NC) obtidas neste trabalho.	53
Figura 17. Distribuição do tamanho das partículas de nanocelulose (NC) pela intensidade de sinal.	56
Figura 18. Distribuição do tamanho das partículas de NC pelo número de partículas.....	57
Figura 19. Difractogramas obtidos para as amostras celulose e NC.	62
Figura 20. Curvas de TGA e DTG (derivada) das nanoceluloses..	64
Figura 21. Imagens de MEV das amostras de nanocelulose.	67
Figura 22. Imagens de MET das amostras de nanocelulose. (A): NC50%1; (B): NC50%2; (C): NC50%3; (D): NC50%4.....	69

Figura 23. Imagens de MET das amostras de nanocelulose. (A) :NC60%30; (B): NC60%1.	69
Figura 24. Histogramas da distribuição de tamanho das nanoceluloses obtidos por imagens MET.....	70
Figura 25. Difratoogramas de raios X das nanopartículas de HA sintetizadas em diferentes condições experimentais. As condições experimentais são apresentadas na tabela 9.	93
Figura 26. Espectroscopia Raman para as nanopartículas de HA. As condições experimentais são apresentadas na tabela 9.	95
Figura 27. Espectros no FTIR para as nanopartículas de HA sintetizadas em diferentes condições experimentais.....	97
Figura 28. Imagens de microscopia da nanopartículas de HA sintetizadas nas diferentes condições experimentais apresentadas na tabela 9.	99
Figura 29. Histogramas da distribuição de tamanho das nanopartículas de hidroxiapatita obtidos por imagens de MEV e MET.....	100
Figura 30. Gráfico de Pareto demonstrando os valores padronizados dos efeitos médio, secundários e terciários.	102
Figura 31. Superfície de resposta para o efeito tamanho das nanopartículas de hidroxiapatita.. ..	105
Figura 32. Representação geral do grupo uretano.	115
Figura 33. Síntese de poliuretanas.	116
Figura 34. Reação entre o isocianato e a água.	116
Figura 35. Reação de formação de uréia di-substituída.	117
Figura 36. Reação de formação de alofanatos.	117
Figura 37. Reação de formação de biuretos.	117
Figura 38. TDI - mistura de isômeros 2,4-diisocianato de 1-metil-benzeno e 2,6-diisocianato de 1-metil-benzeno.....	118
Figura 39. MDI mistura de isômeros 1,1'-metileno bis (4-isocianato benzeno); 1-isocianato-2-(4-isocianato fenil) metilbenzeno; 1,1'-metileno bis (2-isocianato benzeno).....	119
Figura 40. Ácido ricinoléico principal composto do óleo de mamona	121
Figura 41. Técnica <i>one-shot</i> para obtenção das poliuretanas.....	124
Figura 42. Imagens de microscopia ótica e a correspondente fotografia dos nanocompósitos de poliuretana e nanopartículas de hidroxiapatita obtidos.....	128
Figura 43. Imagens de microscopia ótica dos nanocompósitos de poliuretana e nanocelulose obtidos.....	128

Figura 44. Imagens dos nanocompósitos de poliuretana e nanopartículas de hidroxiapatita e nanocelulose obtidos.....	129
Figura 45. Espectros de infravermelho da poliuretana e dos nanocompósitos de poliuretana com nanopartículas de hidroxiapatita e nanocelulose.	130
Figura 46. Curvas de DSC para a poliuretana pura e dos nanocompósitos.	132
Figura 47. Curvas de TGA e DTA das amostras de poliuretana e dos nanocompósitos.	135
Figura 48. Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos nanocompósitos de poliuretana sintetizados com nanopartículas de hidroxiapatita.	138
Figura 49. Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos nanocompósitos de poliuretana sintetizados com 0,5% nanocelulose.	139
Figura 50. Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos nanocompósitos de poliuretana sintetizados com 0,5% nanopartículas de hidroxiapatita e 0,5% nanocelulose.	139
Figura 51. Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos nanocompósitos de poliuretana sintetizados com 1% nanopartículas de hidroxiapatita e 0,5% nanocelulose.	140
Figura 52. Histogramas do tamanho das células observados nos nanocompósitos.....	141
Figura 53. Viabilidade celular de células MEF cultivadas sobre amostras de PU pura e modificada com nanopartículas de HA em diferentes concentrações. Resultados expressos como % da viabilidade celular.....	142

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de celulose de vários materiais.	34
Tabela 2. Famílias de nanoceluloses. Fonte: KLEMM <i>et al.</i> , 2011.....	38
Tabela 3. Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar.	48
Tabela 4. Composição química da fração fibra do bagaço de cana-de-açúcar.	49
Tabela 5. Principais vibrações observadas para fibras (Alemdar; Sain, 2008; Lu; Hsieh, 2010; Mandal; Chakrabarty, 2011; Sain; Panthapulakkal, 2006; Sun et al., 2005).	54
Tabela 6. Potencial Zeta das melhores suspensões obtidas nos experimentos de extração das nanoceluloses.....	58
Tabela 7. Índices de cristalinidade (IC) e o diâmetro dos cristalitos das amostras estudadas. .	60
Tabela 8. Dados de temperatura de início de degradação (T_{ONSET}) e temperatura do término da degradação (T_{ENDSET})	65
Tabela 9. Matriz do planejamento fatorial 2^3 para a síntese das nanopartículas de hidroxiapatita.	90
Tabela 10. Tamanhos de cristalitos (L) para diferentes picos de difração das nanopartículas de hidroxiapatita. As condições experimentais são apresentadas na tabela 9.	94
Tabela 11. Matriz do projeto fatorial e tamanho médio de partícula descrevendo as nanopartículas HA preparadas em cada experimento. A temperatura (T), tempo (t) e a concentração dos precursores (C) foram as variáveis estudadas. Os efeitos calculados para o projeto fatorial também foram apresentados.	102
Tabela 12. Tabela ANOVA para o modelo proposto.....	104
Tabela 13. Valores de Tg (°C) determinadas para os nanocompósitos por meio das curvas de DSC.	132
Tabela 14. Dados de temperatura de início de degradação (T_{ONSET}), temperatura do término da degradação (T_{ENDSET}) e a temperatura máxima taxa de degradação (T_{MAX}).	136

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABS - Acrilonitrila-estireno-butadieno
AFM - Microscopia de Força Atômica
 β -TCP - Fosfato Tricálcio
C - Concentração de precursores
CMF - Celulose Microfibrilada
CNC - Celulose Nanocristalina
CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento
DLS - Espalhamento de Luz Dinâmico
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO - Dimetilsulfóxido
DP - Grau de Polimerização
DRX - Difração de Raios X
DRIFT - Reflectância Difusa
DSC - Calorimetria Diferencial de Varredura
DTG - Termogravimétrica Derivada
DW - Dubin-Watson
FEG-SEM - Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo
FTIR - Infravermelho com Transformada de Fourier
HA - Hidroxiapatita
IC - Índices de Cristalinidade
IV - Espectroscopia no Infravermelho
MAE - Erro Absoluto Médio
MDI - Difenil metano diisocianato
MEF - Fibroblasto Embrionário de Murinos
MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio
Mw - Massa molecular média
NC - Nanocelulose
NC50%1 - Nanocelulose preparada com ácido sulfúrico 50% (v/v) por 1 hora
NC50%2 - Nanocelulose preparada com ácido sulfúrico 50% (v/v) por 2 horas

NC50%3 - Nanocelulose preparada com ácido sulfúrico 50% (v/v) por 3 horas

NC50%4 - Nanocelulose preparada com ácido sulfúrico 50% (v/v) por 4 horas

NC60%1 - Nanocelulose preparada com ácido sulfúrico 60% (v/v) por 1 hora

NC60%30 - Nanocelulose preparada com ácido sulfúrico 60% (v/v) por 30 minutos

NCB - Nanocelulose Bacteriana

PNVCL - *Poli(N-vinilcaprolactama)*

PU - Poliuretana

SFB - Soro Bovino Fetal

t - Tempo de reação

T - Temperatura de síntese

TDI - Tolueno Diisocianato

TTCP - Fosfato Tetracálcio

T_{ENDSET} - Temperatura do término da degradação

TGA - Análise Termogravimétrica

T_{máx} - Temperatura de degradação máxima

T_{ONSET} - Temperatura de início de degradação

UNICA - União das Indústrias de Cana-de-açúcar de São Paulo

APRESENTAÇÃO

A utilização de materiais derivados de fontes vegetais abundantes para o processamento de novos compósitos poliméricos é de grande interesse técnico-científico por atender às necessidades econômicas e de sustentabilidade. Nesse sentido o bagaço de cana-de-açúcar destaca-se como fonte de celulose e derivados para o processamento de novos materiais compósitos poliméricos. Além disso, ele pode ser utilizado para produzir nanocelulose para melhorar as propriedades dos polímeros formando nanocompósitos. A presença de nanocelulose forma uma rede tridimensional ao longo da matriz polimérica, possibilitando assim um reforço nas propriedades termomecânicas e visco-elásticas dos nanocompósitos.

Os avanços nos estudos sobre nanocompósitos incentivam a busca por materiais biocompatíveis com o corpo humano, o que constitui um grande desafio. O poliuretano biodegradável (PU) é um dos materiais biocompatíveis mais utilizados como matrizes extracelulares temporárias em implantes. Uma alternativa promissora no campo dos biomateriais é a preparação de nanocompósitos poliméricos. Associando propriedades de polímeros a nanopartículas para proporcionar a melhor interação entre tecido humano e biomaterial e melhoradas propriedades mecânicas e térmicas. Entre os biomateriais, a hidroxiapatita foi aplicada em vários campos de pesquisa biomédica devido à sua semelhança com os constituintes minerais dos ossos e dentes humanos. As nanopartículas de hidroxiapatita sintética apresentam boa biocompatibilidade, bioatividade e osteoinducibilidade.

O preparo de nanocompósitos poliméricos permite, em muitos casos, encontrar uma relação entre baixo custo, devido à utilização de menor quantidade de carga e um elevado nível de desempenho. Pensando nisso o uso de nanopartículas com propriedades diferentes promove uma sinergia entre os componentes melhorando propriedades térmicas e mecânicas com menores quantidades de carga.

Neste trabalho buscou-se a obtenção de nanocompósitos de poliuretanas preparadas com óleo vegetais reforçadas com nanopartículas de hidroxiapatita e/ou nanocelulose. As nanopartículas de hidroxiapatita foram

sintetizadas por rota hidrotérmica e as nanoceluloses foram obtidas por hidrólise ácida a partir da fibra do bagaço de cana-de-açúcar. As nanopartículas foram incorporadas na matriz polimérica por meio da polimerização *in situ* da poliuretana na presença das nanopartículas. Foram estudadas as melhores condições de síntese dos nanocompósitos assim como o efeito sinérgico da incorporação de duas nanopartículas distintas. Buscando a obtenção de nanocompósitos biocompatíveis para a utilização como próteses médico/odontológicas.

Este texto está organizado em capítulos para melhor compreensão dos resultados obtidos. O primeiro trata-se da extração da nanocelulose a partir do bagaço de cana-de-açúcar; o segundo da síntese de nanopartículas de hidroxiapatita e para finalizar o terceiro capítulo discute a inserção das nanopartículas obtidas na matriz polimérica de poliuretana.

Parte A: Extração e Caracterização de Nanocelulose da Fibra do Bagaço de Cana-de-açúcar

1- Introdução

O bagaço de cana-de-açúcar vem despertando o interesse no processamento de novos materiais por atender às necessidades econômicas e de sustentabilidade (CHERIAN *et al.*, 2010). O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto lignocelulósico, resultante da moagem da cana-de-açúcar pelas usinas de açúcar e álcool, sendo utilizado como fonte de energia, alimentação de animais e fabricação de papel (MANDAL; CHAKRABARTY, 2011; PANDEY *et al.*, 2000). É constituído por aproximadamente 90% de fibra e medula e 10% de extrativos. Contém aproximadamente 50% de celulose, o que o torna uma excelente fonte de polpa celulósica (SUN *et al.*, 2004; TEIXEIRA *e al.*, 2011), 35% hemiceluloses, e o restante é principalmente lignina (MANDAL; CHAKRABARTY, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Apesar de atualmente o bagaço de cana-de-açúcar em sua maioria ser queimado para gerar energia para as usinas, uma grande quantidade é desperdiçada. Por essa razão, vários trabalhos têm sido realizados buscando alternativas para sua reciclagem. Por exemplo, a utilização da celulose para a produção de etanol de segunda geração pelo processo de hidrólise enzimática e hidrólise ácida (SARROUH *et al.*, 2007), produção de compósitos e derivados celulósicos (CERQUEIRA *et al.*, 2010). Vários processos e produtos utilizam o bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima, incluindo a geração de eletricidade, produção de papel e celulose, e produtos à base de fermentação (MANDAL; CHAKRABARTY, 2011; TAN *et al.*, 2000).

A celulose pode ser quebrada em partículas micrométricas ou nanométricas, ampliando suas aplicações. Nestas dimensões as partículas de celulose podem se apresentar como: fibrilas, agulhas (*whiskers*) e esferas. A nanocelulose é transparente e tem oito vezes a resistência à tração do aço inoxidável graças ao entrelaçamento dos cristais, que têm o formato de agulhas (KLEMM *et al.*, 2011). Pode-se obter nanocelulose por hidrólise química ou

pela combinação de quebra com elevadas forças mecânicas com a hidrólise enzimática (TEIXEIRA *et al.*, 2011). A hidrólise química é uma das técnicas mais utilizadas devido ao controle das condições de síntese e possibilidade de obtenção de diferentes morfologias (CHERIAN *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2011), sendo aplicada nas indústrias alimentícia, de cosméticos, farmacêutica, de papel e em nanocompósitos poliméricos como agentes de reforços para melhoria nas propriedades térmicas, mecânicas, de barreira e para aumentar a biodegradabilidade (CHENG; WANG; RIALS, 2009; ORTS *et al.*, 1998).

No setor de materiais poliméricos, um dos focos da nanotecnologia é a obtenção de nanocompósitos (NAM *et al.*, 2001). Os nanocompósitos são materiais compósitos nos quais a fase dispersa apresenta uma das suas dimensões em escala nanométrica (ROY; KOMARNE; ROY, 1984). Nesta escala, mesmo em pequenas quantidades, a presença destas nanopartículas promove melhorias significativas nas propriedades mecânicas, térmicas, e físico-químicas da matriz (ALEXANDRE; DUBOIS, 2000; ESTEVES; TIMMONS; TRINDADE, 2004; OBERDISSE, 2005; WANG *et al.*, 2001; WINEY; VAIA, 2007). Tudo isso mantendo ou melhorando as características de processabilidade dos polímeros. A utilização da nanocelulose destaca-se para a produção de materiais nanocompósitos sustentáveis, para a área médica e ambiental (KLEMM *et al.*, 2011). Acredita-se que as nanocelulose na forma de nanofibras ou de *nanowhiskers* formem uma rede de percolação ao longo da matriz polimérica, possibilitado assim um significativo reforço nas propriedades termomecânicas, visco-elásticas e de barreira (FAVIER *et al.*, 1995; SCHAEFER; JUSTICE, 2007).

Deve-se considerar também o desafio tecnológico tanto na produção da nanocelulose quanto no que se refere aos nanocompósitos poliméricos. Pois, tem-se escrito muito sobre nanotecnologia e sua potencial revolução, e neste cenário os nanocompósitos aparecem com bastante destaque. Os polímeros tanto naturais (celulose, amido e borracha) quanto artificiais (polietileno, poliestireno e Acrilonitrila-estireno-butadieno (ABS)) por si só já representam um importante papel tecnológico antes do advento da nanotecnologia e os novos estudos com os nanocompósitos ampliaram ainda

mais as possibilidades de aplicação. De modo geral, os nanocompósitos diferem dos polímeros comuns por possuírem maior resistência química, mecânica e térmica, maior resistência à fadiga, propriedades anti-chama e algumas vezes propriedade de degradabilidade (FAVIER *et al.*, 1995; OBERDISSE, 2005; WANG *et al.*, 2001).

Esta etapa do trabalho tem como objetivo a obtenção de nanocelulose a partir do bagaço de cana-de-açúcar, para serem inseridos em uma matriz orgânica polimérica, com o objetivo de modificar, realçar ou mesmo induzir novas propriedades mecânicas e químicas aos materiais nanocompósitos em relação às matrizes poliméricas puras.

2- Revisão Bibliográfica

2.1- Biomassa

Todo recurso renovável oriundo de matéria orgânica (de origem vegetal ou animal) voltada para fins energéticos pode ser considerado como biomassa. Normalmente, excluem-se os tradicionais combustíveis fósseis (CORTEZ; LORA; GÓMEZ, 2008).

A biomassa vegetal é considerada uma das principais alternativas para a diversificação da matriz energética e a consequente redução da dependência dos combustíveis fósseis. Dela é possível obter energia elétrica e biocombustíveis, cujo consumo é crescente em substituição a derivados de petróleo como o óleo Diesel e a gasolina (AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA, 2008; PANDEY *et al.*, 2000; SENE *et al.*, 2002). Além disso, a biomassa vem despertando interesse na produção de novos materiais, como a celulose, nanocelulose, carboximetilcelulose e metilcelulose (FLAUZINO NETO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2009).

As vantagens do uso da biomassa na produção de energia e de novos materiais são: o baixo custo, o fato de ser renovável, permitir o reaproveitamento de resíduos e ser menos poluente que outras fontes de energia (COSTA NETO *et al.*, 2000; PANDEY *et al.*, 2000).

A renovação da biomassa ocorre por meio do ciclo do carbono. A queima de biomassa e a respiração dos seres vivos provoca a liberação de

dióxido de carbono. As plantas, por meio da fotossíntese, transformam o CO₂ nos carboidratos, liberando oxigênio. Portanto considera-se o balanço de emissões de CO₂ proveniente da queima de biomassa, é nulo.

Dentre as fontes de biomassa, destaca-se a cana-de-açúcar que é uma cultura extensivamente empregada no Brasil. O bagaço de cana é obtido como subproduto nas usinas de açúcar e álcool, e pode ser utilizado como matéria-prima em diversos processos. Para a geração de eletricidade, produção de celulose e papel e produtos com base na sua fermentação (PANDEY *et al.* 2000; SENE *et al.*, 2002; ZANDERSONS *et al.*, 1999).

Neste trabalho, utilizamos como matéria prima o bagaço de cana-de-açúcar. No Brasil utilizado apenas como geração direta de energia pela queima do mesmo nas indústrias sucroalcooleiras.

2.2- Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum*. Há pelo menos seis espécies do gênero, sendo a cana-de-açúcar cultivada um híbrido multiespecífico, recebendo a designação "*Saccharum spp.*". É uma planta da família Poaceae, representada pelo milho, sorgo, arroz e muitas outras gramíneas. As principais características dessa família são a forma da inflorescência (espiga) e o crescimento do caule em colmos. Os colmos, caracterizados por nós bem marcados e entrenós distintos, quase sempre fistulosos, são espessos e repletos de suco açucarado. As flores, muito pequenas, formam espigas florais, agrupadas em panículas e rodeadas por longas fibras sedosas, congregando-se em enormes pendões terminais, de coloração cinzento-prateado (TRIANA *et al.*, 1990).

A Figura 1 mostra esquematicamente a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e os seus principais constituintes.

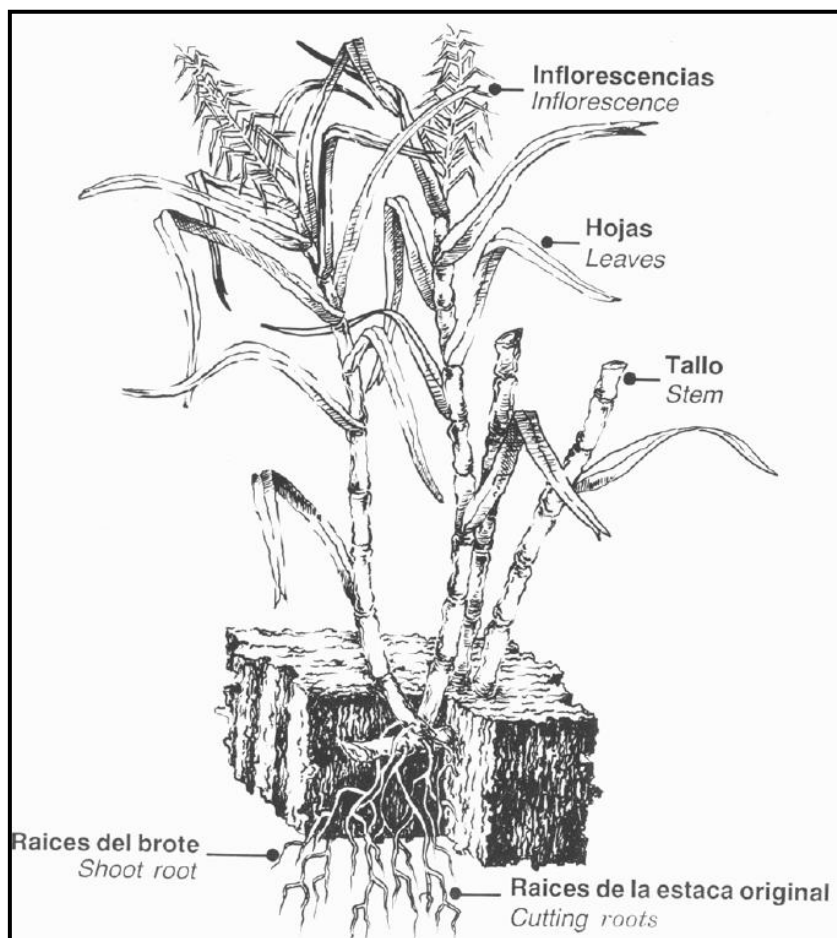


Figura 1. Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). (Fonte: TRIANA *et al.*, 1990)

De acordo com a Conab (Companhia Nacional de Abastecimento) o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com produção estimada nacional, para a safra 2017/18 de 647,6 milhões de toneladas de cana-de-açúcar. O Centro-Oeste tem produção 136,17 milhões de toneladas, safra 2017/18. O aumento da demanda mundial por etanol, oriundo de fontes renováveis, aliado às grandes áreas cultiváveis e condições edafoclimáticas favoráveis à cana-de-açúcar, tornam o Brasil um país promissor para a exportação de derivados de cana. A produção de açúcar alcançou 38,70 milhões de toneladas e o volume fabricado de etanol sofreu redução de 4,9% no período, em razão da preferência pela produção de açúcar, totalizando 26,45 bilhões de litros (CONAB, 2013). Do seu processo de industrialização obtêm-se como produtos o açúcar nas suas mais variadas formas e tipos, o álcool (anidro e hidratado), o vinhoto e o bagaço (MELO *et al.*, 2006).

2.2.1- Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço da cana-de-açúcar é o resíduo industrial lignocelulósico fibroso obtido do esmagamento dos colmos da cana-de-açúcar para extração do caldo da cana. É formado por um conjunto de partículas heterogêneas de diferentes tamanhos, que variam de 1,0 até 25,0 mm, podendo variar dependendo do processamento (ICIDCA, 1990). Os materiais lignocelulósicos são constituídos por celulose, polioses e lignina, com pequenas quantidades de extrativos e sais minerais (FENGEL E WEGENER, 1989). A utilização integral desses componentes é um procedimento desejável tanto do ponto de vista econômico como ambiental.

Uma tonelada de cana gera cerca de 320 kg de bagaço, do quais 90% são queimados para a produção de energia. O bagaço representa uma importante matéria-prima para produção de energia na própria usina, para a produção de biocombustível (etanol) e para alimentação de animais (ORLANDO *et al.*, 2002). E em alguns países, como Cuba, é utilizado para fabricação de papel.

Do ponto de vista físico, o bagaço industrial é constituído por cerca de 45% de sólidos orgânicos insolúveis, 2-3% de sólidos insolúveis, 2-3% de sólidos solúveis e 50% de umidade. Os sólidos inorgânicos insolúveis em água são principalmente terra, pedras e outros materiais estranhos, originários do processamento da cana-de-açúcar. Os sólidos solúveis são compostos na maior parte de sacarose residual do processo de moagem. A fração de sólidos orgânicos insolúveis é composta por toda a fração sólida orgânica, insolúvel em água, presente originalmente nos colmos da cana, e se caracteriza por sua heterogeneidade do ponto de vista morfológico. É a fração que contém os elementos estruturais necessários para a produção de celulose e papel.

Cerca de 90% do bagaço seco é constituído de material insolúvel em água que correspondem às fibras e medula. Esta fração de material orgânico é composta por cerca de 55 a 60% de fibras (células de esclerênquima), 30 a 35% de medula (células de parênquima) e 10 a 15% de outros componentes, resíduos finos do processo de moagem, terras e solúveis. As características

das fibras do bagaço de cana-de-açúcar são equivalentes às características das fibras de madeira folhosas (PASQUINI, 2004; ICIDCA, 1990). As fibras do bagaço são rígidas, de contornos bem definidos e se separaram, como resultado de trabalho mecânico a que são submetidas durante seu processamento industrial. O parênquima possui uma anisotropia com formas variadas e irregulares e cumpre a função de armazenamento (ICIDCA, 1990). A Figura 2 mostra a imagem de microscopia do bagaço integral.

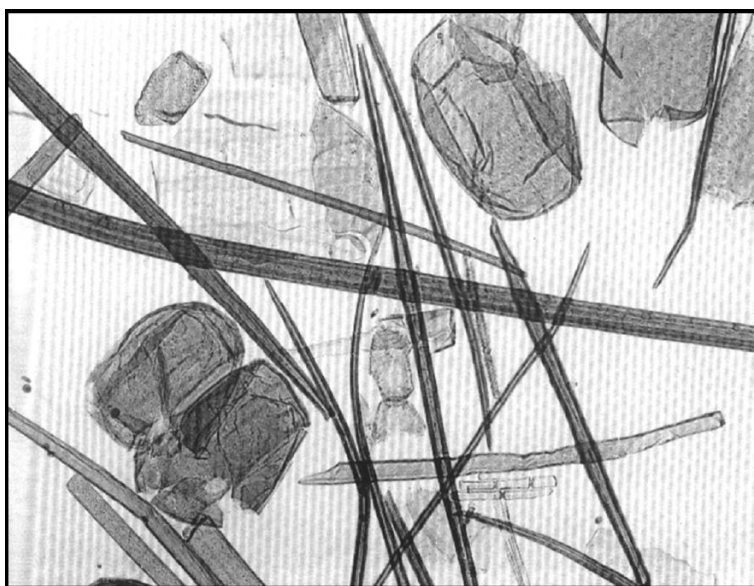


Figura 2. Bagaço integral (M.O. 425x). (FONTE: TRIANA *et al.*, 1990)

O bagaço de cana pode ser considerado a partir de duas importantes características: Elevado teor de umidade – variando entre 48 e 52% da sua massa total; ampla faixa de distribuição granulométrica das partículas que o compõem (partículas que variam em tamanho, forma, densidade, etc.).

As aplicações do bagaço da cana seguem duas grandes rotas tecnológicas. A primeira como fonte direta e indireta de produção de energia: refere-se ao seu uso como combustível em caldeiras para a geração de vapor e energia elétrica, e produção de etanol. A segunda aplicação considera a utilização como insumo ou matéria-prima: o bagaço pode ser utilizado como fonte de obtenção de fibra para polpa celulósica (papel e papelão), para fabricação de compensados, alimento animal, furfural, e outros produtos

químicos (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010; ICIDCA, 1990; MARTÍN *et al.*, 2006).

Para utilização do bagaço de cana-de-açúcar na obtenção de polpa celulósica para fabricação de papel é necessário à realização do desmedulamento do bagaço. Que consiste no enriquecimento da fração fibrosa por meio da retirada de medula, fazendo com que haja um aumento na fração de fibras para 70 a 80% e redução da fração medula para 10 a 20% (PASQUINI, 2004).

Na utilização sustentável do bagaço da cana para a produção de eletricidade por meio de usinas termelétricas, o balanço de emissões de CO₂ é praticamente nulo (BRASIL, 2008). Os principais aspectos negativos são a interferência no tipo natural do solo e a possibilidade da formação de monoculturas em grande extensão de terras – o que competiria com a produção de alimentos (BRASIL, 2008).

2.2.1.1 - Composição química do Bagaço de Cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é composto por celulose, hemicelulose e lignina. Apresenta também pequenas quantidades de outros compostos componentes classificados em conjunto como estranhos ou extrativos. Os valores médios para a composição do bagaço de cana-de-açúcar são de 41-44% para celulose; 25-27% para hemiceluloses; 20-24% para lignina e 10% para extrativos (ICIDCA, 1990; PATURAU, 1969; TRIANA *et al.*, 1990).

Quando comparado às madeiras moles, o bagaço contém menor teor de lignina, menor conteúdo de alfa-celulose e maior conteúdo de pentosanas. A composição química do bagaço se assemelha mais às madeiras de folhosas do que às madeiras de coníferas (TRIANA *et al.*, 1990).

2.2.1.2- Polioses (Hemicelulose)

O termo polioses refere-se a uma mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular, os quais estão associados com a celulose nos tecidos das plantas. As polioses, também chamadas de hemiceluloses, são polímeros cuja composição podem conter proporções variadas: xilose, manose, glucose,

arabinose, galactose, ácido galactourônico, ácido glucourônico e ácido metilglucourônico. Sua massa molar é cerca de 10 a 100 vezes menor do que a da celulose. As poliooses são diferenciadas da celulose pela facilidade de hidrólise por ácidos diluídos e solubilidade em soluções alcalinas (FENGEL; WEGENER, 1989; KLOCK *et al.*, 2005). A Figura 3 mostra as unidades de açúcar mais comuns que constituem as poliooses.

As poliooses mais abundantes no bagaço de cana-de-açúcar são do tipo D-xilanos, formados principalmente por unidades de D-xilose na cadeia principal, substituído por grupos acetil metilado e ácidos urônicos. Possuem cadeias poliméricas curtas, com massa molecular viscosimétrica na faixa de 10.000 a 20.000 e constituem de 25 a 27% dos compostos do bagaço (ICIDCA, 1990; PATURAU, 1969; TRIANA *et al.*, 1990).

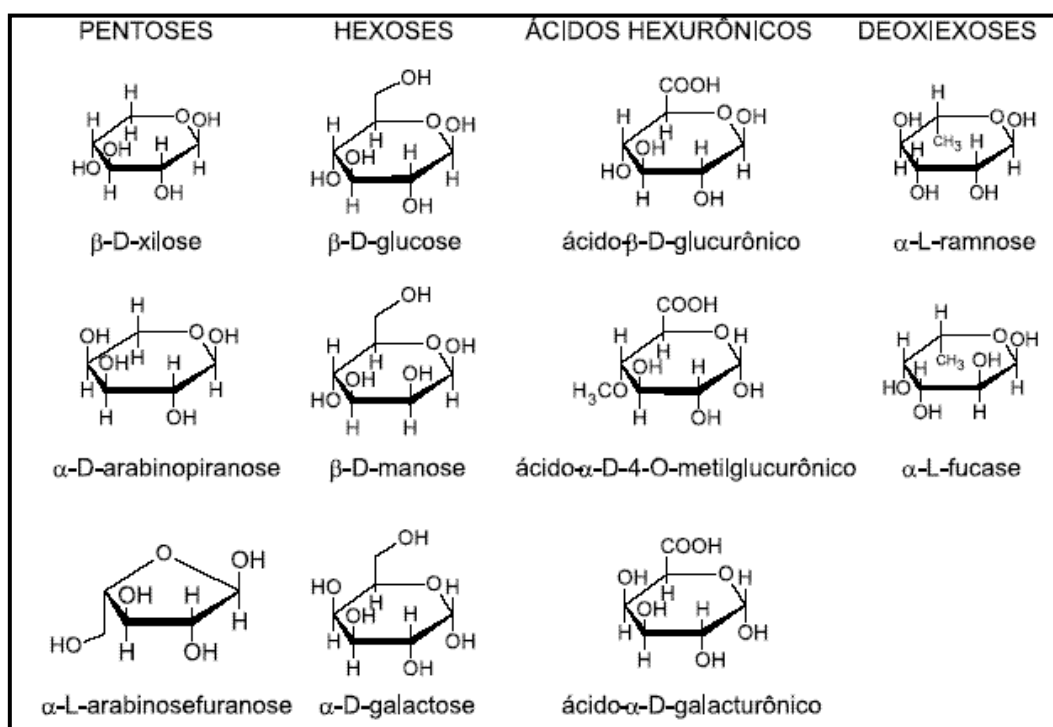


Figura 3. Açúcares que compõem as unidades de poliooses. (FONTE: MORAIS; NASCIMENTO; MELO, 2005)

2.2.1.3- Lignina

A lignina é um polímero amorfo, altamente complexo e principalmente aromático, que constituem partes das paredes celulares e da lamela média de

vegetais (BROWNING, 1967). A lignina tem ocorrência típica nos tecidos vasculares, especializados para transporte de líquidos. Precedida apenas pela celulose, a lignina é a substância orgânica natural mais abundante e também a maior fonte de carbonos aromáticos (CURVELO, 1992; FENGEL; WEGENER, 1984; SJÖSTRÖM, 1981).

A unidade estrutural da lignina é a unidade fenilpropano ou unidade C₉, a qual contém um anel benzênico com uma cadeia lateral propânica (Rowell, 2005). As substâncias precursoras primárias da lignina são os alcoóis: p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 4). Considerando o padrão de substituição do anel aromático, estes três alcoóis dão origem aos grupos p-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S) (D'ALMEIDA, 1988; FENGEL; WEGENER, 1984; PILÓ-VELOSO; NASCIMENTO; MORAIS, 1993; SJÖSTRÖM, 1981).

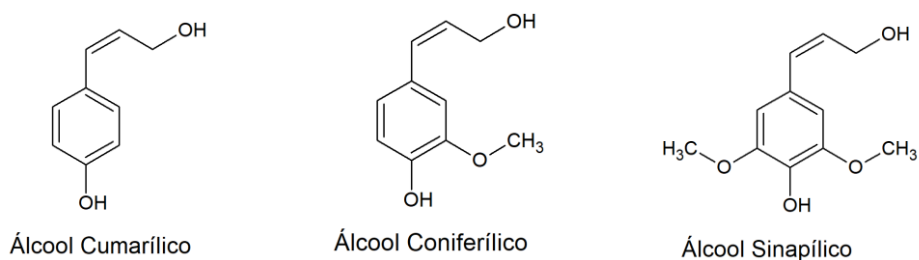


Figura 4. Precursores primários da lignina.

As unidades fenilpropânicas das ligninas são unidas por ligações éter e carbono-carbono, formando estruturas complexas. A Figura 5 apresenta o modelo formulado por Nimz para madeira de folhosas (FENGEL; WEGENER, 1984).

O isolamento da lignina só é possível por meio da fragmentação da macromolécula em partes menores, ou seja, envolve a ruptura de ligações químicas com a consequente diminuição da massa molar. Estes processos de isolamento utilizam reagentes que atacam tanto a lignina quanto os polissacarídeos e são empregados na polpação de diferentes matérias-primas lignocelulósicas.

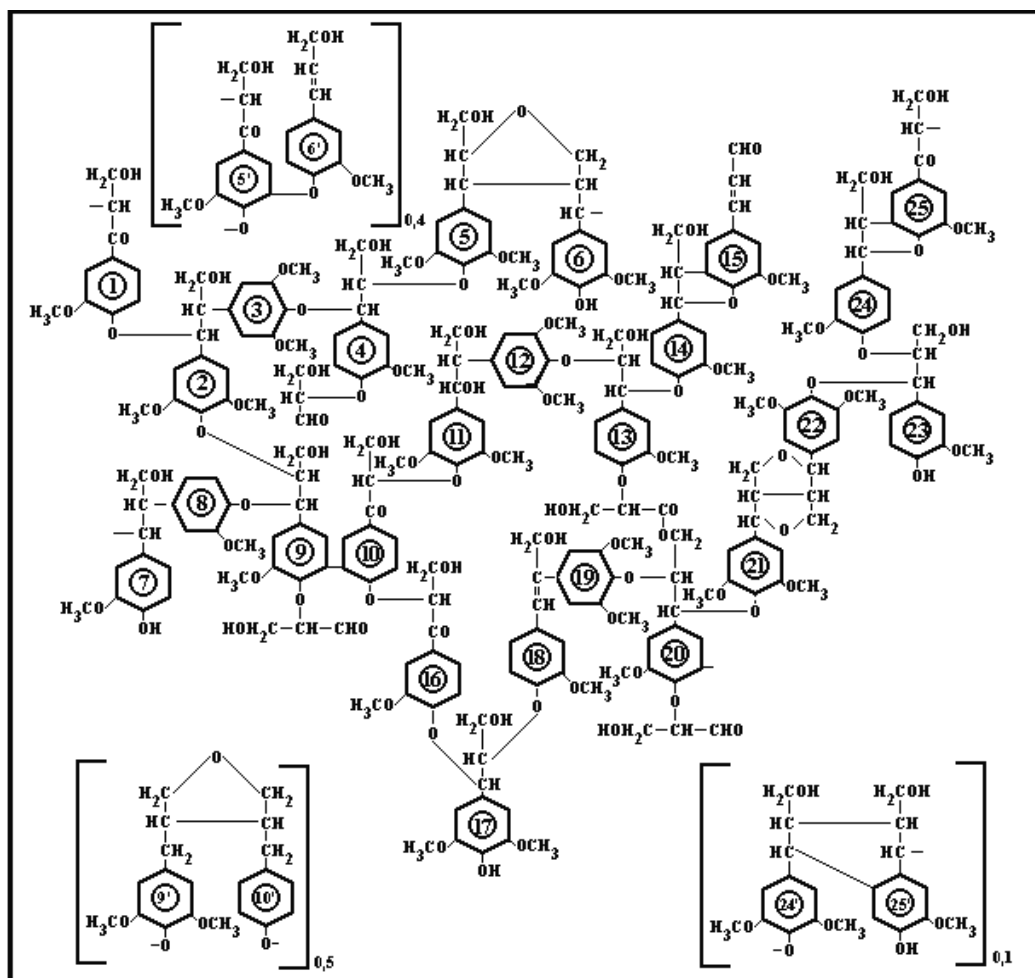


Figura 5. Modelo de lignina de faia, proposto por NIMZ (1974).

2.2.1.4- Celulose

A celulose responde isoladamente por aproximadamente 40% de toda reserva de carbono disponível na biosfera, é a fonte mais abundante deste elemento. Está presente em todas as plantas, desde árvores altamente desenvolvidas até o mais primitivo dos organismos; seu conteúdo nestas espécies pode variar entre 20 e 99%, como mostra a tabela 1 (FENGEL; WEGENER, 1989).

Celulose é um polissacarídeo de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$ que está presente nos tecidos vegetais como componente principal. Pode-se definir como polímero natural cuja unidade repetitiva é a celobiose, formada por cadeias longas, uniformes, e unido por ligações glicosídicas β -(1-4), Figura 6 (FENGEL; WEGENER, 1989; ROWELL, 2005).

Tabela 1. Conteúdo de celulose de vários materiais.

Material	Celulose (%)
Algodão	95 – 99
Rami	80 – 90
Bambu	40 – 50
Madeira	40 – 50
Cascas	20 – 30
Musgos	25 – 30
Bactérias	20 – 30

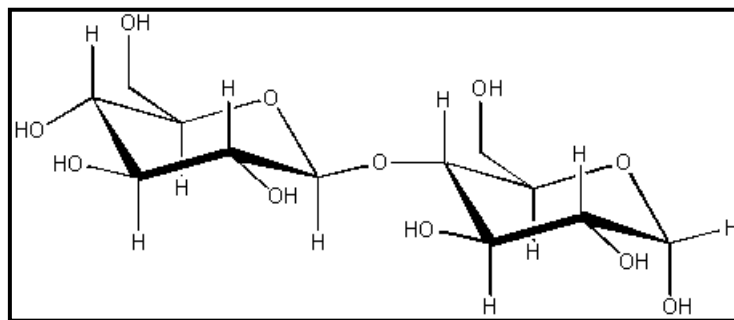


Figura 6. Unidade de celobiose. (FONTE: FENGEL; WEGENER, 1989)

As cadeias de celulose são lineares de alinhamento paralelo e estão ligadas por ligações de hidrogênio para formar microfibrilas. Grupos de microfibrilas originam as fibrilas que por sua vez formam as fibras da celulose (ZYKWINSKA, *et al.*, 2005). O número de unidades de glicose em uma molécula de celulose é indicado pelo grau de polimerização (DP). O DP médio para a celulose nativa de várias fontes é de pelo menos 9 e 10 kDa e podendo chegar até 15 kDa (ROWELL, 2005).

Moléculas de celulose são orientadas aleatoriamente e formam ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. São as principais responsáveis pela estrutura supramolecular da celulose. As microfibrilas constroem fibrilas e estas constroem as fibras celulósicas (Figura 8). Como consequência, a celulose possui alta resistência à tração e é insolúvel na maioria dos solventes (D'ALMEIDA, 1988). À medida que aumenta a densidade de empacotamento da celulose, são formadas regiões cristalinas. A maior parte da celulose

derivada de madeiras é cristalina e pode conter até 65% de regiões cristalinas. A porção remanescente tem uma densidade de empacotamento inferior e é referida como a celulose amorfa (ROWELL, 2005; SJÖSTRÖM, 1981).

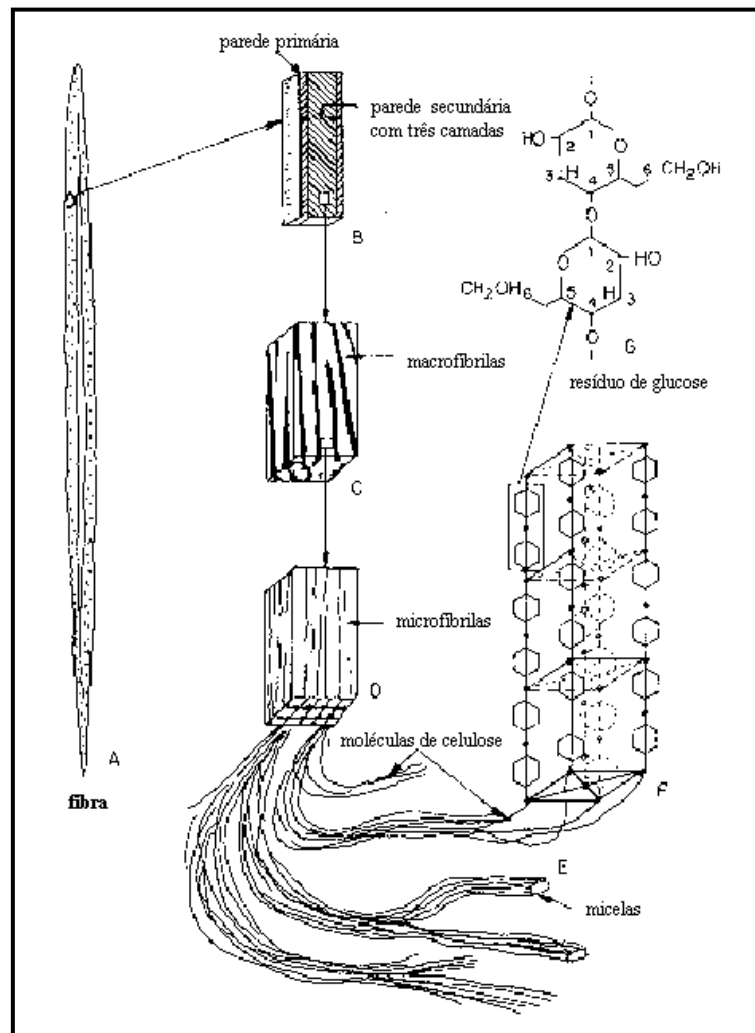


Figura 7. Esquema da estruturação das fibras da celulose. (FONTE: D'ALMEIDA, 1988)

Gardner e Blackwell, 1974 apontaram que a celulose cristalina tem uma simetria grupo espacial em que $a = 16,34 \text{ \AA}$ e $b = 15,72 \text{ \AA}$. A distância de uma unidade de repetição é $C = 10,38 \text{ \AA}$ (Figura 8). A célula unitária contém oito porções de celobiose. Esta estrutura é referida como celulose I ou celulose nativa. A celulose II é outro tipo de celulose usada para fazer derivados de celulose. Ela não é encontrada na natureza. Celulose II é obtida pela mercerização e regeneração de celulose nativa. Mercerização é o tratamento

de celulose I com álcalis fortes. A regeneração é o tratamento com dissulfeto de carbono para formar um derivado xantato solúvel, posteriormente, convertido em celulose e precipitado novamente como celulose II. Celulose II tem um grupo de espaço $a = 8,01 \text{ \AA}$, $b = 9,04 \text{ \AA}$, e $c = 10,36 \text{ \AA}$. A Celulose III é obtida com o tratamento da celulose nativa com amônia líquida e a Celulose IV é formada com a aquecimento a alta temperatura num líquido polar, sendo muito semelhante a Celulose I (FENGEL; WEGENER, 1989; ROWELL, 2005).

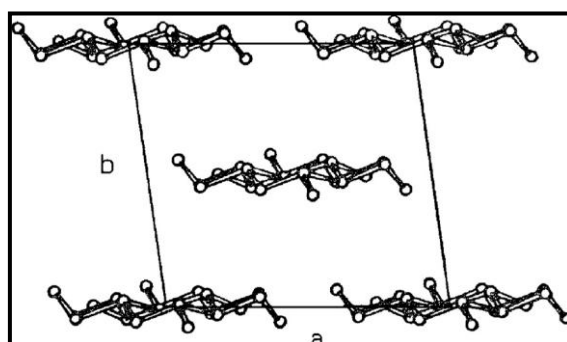


Figura 8. Projeção axial da estrutura da celulose tipo I. $a = 16,34 \text{ \AA}$; $b = 15,72 \text{ \AA}$; $c = 10,38 \text{ \AA}$. (FONTE: ROWELL, 2005)

As moléculas de celulose são lineares e tem tendência para formar ligações de hidrogênio inter e intramoleculares. Os feixes de moléculas de celulose se agregam na forma de microfibrilas, formando regiões ordenadas (cristalinas) que se alternam com regiões amorfas.

A celulose é o principal componente da maioria da biomassa vegetal. É o polímero mais abundante na natureza e é uma fonte sustentável de materiais para uso nos processos industriais. Seu conteúdo no bagaço de cana-de-açúcar corresponde a 41-47% da sua composição em base seca (TRIANA *et al.*, 1990), o que dá a essa biomassa um potencial para ser utilizada como matéria-prima para a produção de celulose e papel, tornando-a comercialmente importante. Cerca de 90% de todas as matérias-primas utilizadas pela indústria do papel para obter celulose é constituída de madeira. As outras matérias-primas utilizadas para esse fim são conhecidas coletivamente como materiais *Nowood* (CHUAN-FU LIU *et al.*, 2006). Além disso, o uso de celulose e seus derivados em um diversificado conjunto de outras aplicações, tais como filmes,

plásticos, revestimentos, agente de suspensão e compósitos, continua a crescer.

2.2.1.4.1- Nanoceluloses

As nanoceluloses são estruturas que apresentam pelo menos uma das dimensões da ordem nanométrica. Podem ser obtidas de diversas fontes, como algas, plantas e bactérias. Para sua produção existem rotas principais, uma delas conhecida como *top down* "de cima para baixo" envolve rotas enzimáticas/físicas/químicas a partir de madeira ou resíduos agrícolas e florestais, a segunda é conhecida como *botton up* "de baixo para cima" e envolve a produção de nanofibrilas de celulose por bactérias a partir de glicose. Estas nanoceluloses combinam propriedades importantes da celulose, tais como a - hidrofiliçidade, grande capacidade de modificação química, e a formação de fibras com morfologias versáteis - com as características de materiais em nanoescala: elevada razão de aspecto e características causadas principalmente pela grande área superficial destes materiais (EICHHORN, 2011; KLEMM *et al.*, 2011).

Com base nas suas dimensões, funções e métodos de preparação, os quais dependem da fonte celulósica e das condições de síntese. As nanoceluloses podem ser classificadas em três subcategorias: celulose microfibrilada (CMF); celulose nanocristalina (CNC); nanocelulose bacteriana (NCB) (tabela 2). Estruturas típicas destes tipos de celulose em nanoescala podem ser vistas nas micrografias eletrônicas (Figura 9).

As microfibrilas têm uma alta razão de aspecto e exibem características de gel em água, com propriedades tixotrópicas e pseudoplásticas. O grande impedimento para o uso comercial tem sido o alto consumo de energia na produção de celulose microfibrilada (CMF) como resultado das várias etapas do homogeneizador. Atualmente, tem-se focado em métodos de produção com eficiência energética, em que as fibras são pré-tratadas por meio de métodos físicos, químicos, e enzimáticos, antes da homogeneização para reduzir o consumo de energia (HERRICK *et al.*, 1983). Algumas aplicações das CMF incluem emulsões e dispersões para produtos alimentícios, médicos,

cosméticos, farmacêuticos, produtos de higiene, aplicações em papéis e como reforço em nanocompósitos (DINAND; CHANZY; VIGNON, 1996; DINAND; VIGNON, 2001; HEUX; DINAND; VIGNON, 1999).

Tabela 2. Famílias de nanoceluloses. Fonte: KLEMM *et al.*, 2011.

Tipo de nanocelulose	Sinônimos	Fontes típicas	Síntese e tamanho médio
Celulose microfibrilada (CMF)	Fibrilas de nanocelulose, nanofibrilas microfibrilas, celulose nanofibrilada	Madeira, beterraba sacarina, tubérculos de batata, cânhamo, linho	Delaminação da polpa mecânica de madeira por pressão, antes e / ou depois de tratamento químico ou enzimático; diâmetro: 5-60 nm; comprimento: vários micrômetros.
Celulose nanocristalina (CNC)	Nanocristais de celulose, cristalitos, <i>whiskers</i> , <i>rodlike</i> celulose microcristalina.	Madeira, algodão, cânhamo, linho, palha de trigo, casca de amoreira, rami, Avicel, tunicin, celulose de algas e bactérias.	Hidrólise ácida da celulose a partir de muitas fontes; diâmetro: 5-70 nm; comprimento: 100 250 nm (celulose de plantas); 100 nm a vários micrometros (a partir de celulases da tunicados, algas, bactérias).
Nanocelulose bacteriana (NCB)	Celulose bacteriana, celulose microbiana, biocelulose.	Açúcares de baixo peso molecular e álcoois.	Biossíntese bacteriana; diâmetro: 20-100 nm; diferentes tipos de redes de nanofibras.

Celuloses nanocristalinas (CNC), também conhecidas como *whiskers*, consistem de cristais de forma cilíndrica alongada (formato acicular) com larguras entre 5-70 nm e comprimentos entre 100 nm e vários micrômetros. Elas são produzidas pela remoção das porções amorfas de uma fonte de celulose purificada por hidrólise ácida, muitas vezes seguida por um tratamento de ultrassons. As fontes de celulose são variáveis e o seu grau de cristalinidade influencia nas dimensões dos cristais liberados. Por exemplo, o algodão, (DONG *et al.*, 1996) madeira e Avicel® produziram uma distribuição estreita e altamente cristalina (90% de cristalinidade). Por outro lado, fontes

como tunicina, (FAVIER; CHANZY; CAVAILLE, 1995; PETERSSON; KVIEN; OKSMAN, 2007) bactérias, (TOKOH *et al.*, 1998; GRUNERT; WINTER, 2002) e algas, geram cristais com maior polidispersibilidade e dimensões comparáveis aos de CMF (largura: 5-60 nm, comprimento: 100 nm a vários micrometros) (REVOL, 1982; ELAZZOUZI-HAFRAOUI *et al.*; 2008). Embora semelhante em tamanho a CMF, eles têm flexibilidade muito limitada, uma vez que não contêm regiões amorfas.

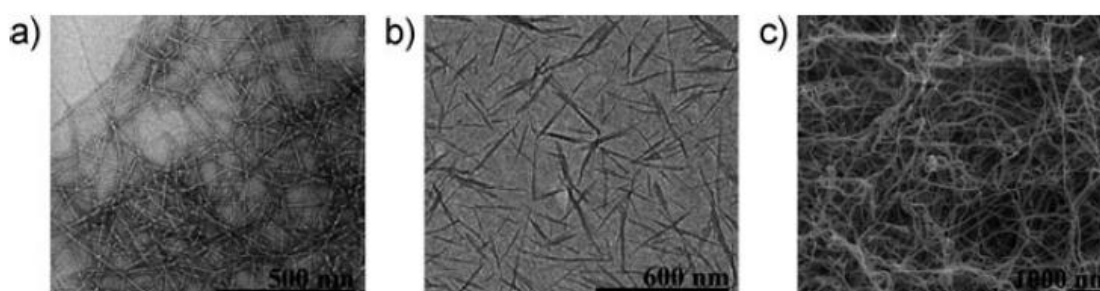


Figura 9. Micrografias eletrônicas de transmissão de a) CMF; b) CNC; c) micrografia eletrônica de varredura do NCB. (Fonte: KLEMM *et al.*, 2011)

Cristais de CNC podem apresentar diferentes geometrias, dependendo da sua fonte. Por exemplo, celulose de algas exibe um arranjo estrutural retangular, enquanto as cadeias de celulose bacteriana e de tunicados tem geometria de fita (ELAZZOUZI-HAFRAOUI *et al.*, 2008; ITOH; BROWN, 1988; REVOL, 1982). O ácido utilizado na hidrólise da celulose influencia nos grupos funcionais da superfície das CNC. Se preparada com HCl é fracamente carregada com cargas negativas. Já com H_2SO_4 ficam mais negativas. Nesse caso, cerca de um décimo das unidades de glicose são funcionalizadas com grupos éster de sulfato. As dimensões dos cristais, também são influenciadas pela duração da hidrólise, tempos mais longos produzem cristais menores (BECK-CANDANEDO, ROMAN, GRAY, 2005; DONG *et al.*, 1996; ELAZZOUZI-HAFRAOUI *et al.*; 2008; REVOL, 1982).

Nanocelulose bacteriana (NCB) é sintetizada por bactérias aeróbias, tais como bactérias de ácido acético do gênero *Gluconacetobacter*, como um componente puro de seus biofilmes. São sintetizadas a partir de fontes de carbono de baixo peso molecular, como o D-glicose. As bactérias são

cultivadas em meio nutriente aquoso comum e a NCB é excretada como exopolissacarídeo. A forma estável do resultante é composta por uma rede de nanofibras (diâmetro da fibra: 20-100 nm), com até 99% de água. As NCB são puras com uma massa molar média alta (M_w), alta cristalinidade, e uma boa estabilidade mecânica. A vantagem da biofabricação de nanocelulose está em se utilizar da biotecnologia branca e para controlar a forma, bem como a estrutura da rede durante a biossíntese de nanofibras (KLEMM *et al.*, 2005; CZAJA *et al.*, 2006; SANI, A.; DAHMAN, 2010).

3- Objetivos

O objetivo dessa pesquisa foi o preparo e a caracterização de nanocelulose como etapa da síntese de nanocompósitos de poliuretana com nanofibras de celulose obtidas a partir do bagaço de cana-de-açúcar, buscando obter melhoradas propriedades térmicas e mecânicas.

4- Materiais e Métodos

4.1- Desmedulamento do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado foi gentilmente cedido pela usina Decal em Rio Verde, Goiás, na safra de 2013. O bagaço industrial vem acompanhado de impurezas como terra, fuligem, e com açúcar residual. Para remover essas impurezas e alguns extrativos solúveis em água, o bagaço passou por um processo de extração em água quente, seguido por desmedulamento úmido a frio por peneiramento. O bagaço de cana-de-açúcar integral foi adicionado a um recipiente contendo água a 80 °C e agitado por cerca de 1 hora, depois passou por uma peneira de 35 Mesh, com auxílio de jatos de água fria. As fibras retidas nesta peneira (células de esclerênquima) foram secas e utilizadas nos experimentos. Este procedimento foi realizado a fim de se remover a fração medula (células de parênquima) e obter uma

amostra mais homogênea. Este procedimento também serviu para eliminar extrativos solúveis em água, em particular açúcares residuais, e compostos inorgânicos.

4.2- Composição química da fração fibra bagaço de cana-de-açúcar

A seguir estão descritos os procedimentos para determinação da composição (umidade, teor de extrativos solúveis em cicloexano/etanol, cinzas, lignina Klason insolúvel, lignina Klason solúvel, α -celulose e hemicelulose) da fibra do bagaço de cana-de-açúcar. Todas as determinações foram realizadas com no mínimo três replicatas.

4.2.1- Teor de umidade

A fração fibra do bagaço de cana-de-açúcar foi submetida ao processo de determinação do teor de umidade. Cerca de 1 g de fibras extraídas foram aquecidas por 6h em estufa a 105°C por cerca de 6 horas. Determinou-se o teor de umidade com base na diferença em massa da fibra, antes e depois do processo de secagem.

4.2.2- Teor de extrativos solúveis em cicloexano/etanol

A fração fibra do bagaço de cana-de-açúcar foi extraída em Soxhlet utilizando uma mistura cicloexano/etanol (1:1, v/v) por 8 horas, conforme norma Tappi T204 cm-97 (Technical Association of the Pulp). Este procedimento foi realizado a fim de remover os extrativos orgânicos solúveis nesta mistura de solventes. Determinou-se o conteúdo de extrativos com base na diferença em massa da fibra seca, antes e depois do processo de extração.

4.2.3- Teor de cinzas

O teor de cinzas da fração fibra do bagaço foi determinado pelo teor de resíduos da queima completa do bagaço e da fibra conforme norma Tappi T211

om-93 modificada. Cerca de 1 g de amostra foi adicionado em um cadinho de porcelana de massa conhecida, este cadinho foi aquecido em mufla à 800 °C por 2 horas. O cadinho foi resfriado e pesado com o resíduo. Determinou-se o conteúdo de cinzas com base na massa do resíduo relativa à massa de bagaço (fibra) seco.

4.2.4- Teor de lignina Klason insolúvel

O teor de lignina Klason total (lignina insolúvel + solúvel) foi obtido seguindo a Tappi 222-om02 modificada. Pesou-se cerca de 1 g de amostra seca e transferiu-se para um almofariz com 15,0 mL de ácido sulfúrico 72% (d = 1,6389 g/mL), agitando por 2 horas. Após esse tempo, transferiu-se a mistura para um balão de 1,0 L, adicionou-se 560 mL de água destilada e aqueceu-se sob refluxo por 4 horas. Em seguida, filtrou-se a lignina insolúvel em um funil de vidro sinterizado nº 4, previamente tarado. Coletou-se o filtrado para análise posterior de lignina Klason solúvel. Secou-se o funil com a lignina insolúvel em estufa a 70 °C por 24 horas. Resfriou-se em dessecador até obtenção de massa constante e pesou-se. A porcentagem de lignina Klason insolúvel foi determinada pela equação a seguir.

$$\%LigninaKlason = \frac{m_1 \times 100}{m_2} \quad (1)$$

Onde:

% lignina= teor percentual de lignina Klason insolúvel.

m_1 = massa (g) de lignina Klason insolúvel seca.

m_2 = massa (g) de amostra inicial seca.

4.2.5- Teor de lignina Klason solúvel

A quantidade de lignina solubilizada em meio ácido foi analisada por meio da espectroscopia na região do ultravioleta. As soluções para as análises foram preparadas a partir do filtrado da etapa anterior, diluído com água até concentração final de ácido sulfúrico de 0,05 mol L⁻¹. Preparou-se uma solução de referência, a partir do ácido sulfúrico 72%, de concentração 0,05 mol L⁻¹.

Foram feitas medidas de absorvância do filtrado nos comprimentos de onda de 280 nm e 215 nm. A concentração (g L^{-1}) de lignina Klason solúvel foi calculada pela seguinte equação:

$$C(\text{g/L}) = \frac{(4,53 \times A_{215}) - A_{280}}{300} \quad (2)$$

Onde:

$C(\text{g L}^{-1})$ = concentração de lignina Klason solúvel em meio ácido.

A_{215} = valor da absorvância a 215 nm.

A_{280} = valor da absorvância a 280 nm.

4.2.6- Obtenção da holocelulose

Para obtenção de holocelulose foi utilizado o método clorito ácido. Uma massa de 5 g da fibra do bagaço de cana seca foi colocada em um frasco erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de água destilada. O frasco de erlenmeyer foi colocado em banho-maria (75 °C) e a ele foram adicionados 2,0 mL de ácido acético e 3,0 g de clorito de sódio, nesta ordem, tampando o frasco erlenmeyer para não ocorrer à perda do gás produzido na reação. Após 1 hora, foi adicionado novamente 2,0 mL de ácido acético e 3,0 g de clorito de sódio. Esse processo foi repetido por mais duas vezes. A mistura foi então resfriada a 10 °C, filtrada em funil sintetizado nº2, previamente seco e tarado, e lavada com água destilada a 5 °C até que o resíduo fibroso apresentasse coloração esbranquiçada e o pH do eluído fosse igual ao da água utilizada na lavagem. Em seguida, o funil com o resíduo fibroso foi seco em estufa a 105 ± 3 °C por 6 horas, resfriado em dissecador e pesado para quantificação de holocelulose.

4.3- Polpação da fibra do bagaço de cana-de-açúcar

A fibra do bagaço de cana-de-açúcar foi triturada em um moinho analítico (Quimis 0298A21 500 W) e posteriormente tratada com uma solução aquosa de hidróxido de sódio a 2% (m/m) durante 4 h a 100 °C sob agitação

mecânica. Em seguida o material foi filtrado, lavado com água da torneira até o pH do eluído fosse aproximadamente 7 e posteriormente, seco a 50 °C durante 12 h em uma estufa com circulação de ar. Após este tratamento, as fibras foram branqueadas com uma solução composta de partes iguais (v:v) de tampão acetato (27 g de NaOH e 75 mL de ácido acético glacial, diluídos a 1 L de água destilada) e clorito de sódio aquoso (NaClO_2 em água a 1,7% m/m). O branqueamento foi realizado a 80°C durante 4 horas. As fibras branqueadas foram filtradas, lavadas com água da torneira até que o pH do eluído fosse aproximadamente 7 e posteriormente secas a 50 °C durante 12 horas em uma estufa com circulação de ar. Este procedimento de purificação tem sido usado e adaptado por outros pesquisadores (FLAUZINO *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2010).

4.4- Preparação das nanoceluloses a partir do bagaço de cana

Foi realizado um estudo preliminar baseado em trabalhos dos autores (ROSA *et al.*, 2010; SANTOS, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2011) para direcionar e otimizar o processo de extração dos cristais de nanocelulose. Foram testadas algumas condições de concentração de ácido sulfúrico, tempo e temperatura. Os primeiros testes foram realizados com concentração de 6 mol.L⁻¹ de ácido sulfúrico, temperatura de 45 °C e tempo de 180 min (ROSA *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2011). Foi realizado também testes com concentração de 9,2 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico, na temperatura ambiente e 75 min (Santos, 2013). As amostras foram submetidas a secagem por liofilização e posteriormente o diâmetro médio das amostras foram medidos por MEV.

Baseados nos resultados obtidos nos testes preliminares de hidrólise ácida realizados, foi proposto um conjunto de experimentos com 6 condições diferentes de hidrólise, todas utilizando concentrações de ácido sulfúrico maiores do que estas inicialmente testadas.

Após a polpação e o branqueamento a fibra foi novamente triturada em um moinho analítico e passada por meio de uma peneira de 35 mesh para homogeneização granulométrica. A hidrólise foi realizada variando a concentração, temperatura e tempo. Para a concentração de 11,5 mol L⁻¹ (60%)

de ácido sulfúrico a temperatura foi de 25 °C e os tempos foram de 30 minutos ou 1 h; para a concentração de 9,6 mol L⁻¹ (50%) de ácido sulfúrico a temperatura foi de 45 °C e os tempos foram de 1, 2, 3 e 4 h de reação. Para cada grama de fibra foram utilizados 30 mL de H₂SO₄. Imediatamente após a hidrólise a suspensão foi diluída 10 vezes com água gelada para parar a reação e centrifugada duas vezes por 10 min a 4000 rpm, para remover o excesso de ácido. O precipitado foi dialisado contra água deionizada até pH neutro (5 - 7 dias) para remoção dos grupos sulfatos que não reagiram, sais e açúcares. Subseqüentemente, a suspensão resultante do processo de diálise foi tratada com um dispensador do tipo Ultraturrax durante 5 min a 20000 rpm e sonicada durante 5 min. A suspensão coloidal foi armazenada sob refrigeração a 4 °C com a adição de clorofórmio para evitar o crescimento de bactérias e fungos.

4.5- Caracterizações

As nanoceluloses foram caracterizadas utilizando: espectroscopia no infravermelho (IV), difração de raios X (DRX), espalhamento de luz dinâmico (DLS), análise termogravimétrica (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

4.5.1- Espectroscopia no Infravermelho das nanoceluloses (IV)

As nanoceluloses foram analisadas em um espectrômetro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Shimadzu modelo IR Affinity-1, empregando-se o método de pastilhas de KBr. As misturas de KBr e nanocelulose em uma razão 100:1 mg foram maceradas e secas em estufa por 2 horas. As pastilhas foram preparadas por prensagem e os espectros foram registrados a partir de 16 varreduras com resolução de 4 cm⁻¹.

4.5.2- Análise de Difração de Raios X das nanoceluloses (DRX)

A celulose e as nanoceluloses foram caracterizadas por difração de raios X (DRX) para determinação da estrutura cristalina e dos correspondentes índices de cristalinidade, empregando um difratômetro Rigaku modelo DMax 2500 PC (radiação Cu K α) com $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$, operando na faixa de 2θ de 3° a 40° , com velocidade de passo de $0,01^\circ$ e tempo de passo de 1s. O índice de cristalinidade (IC) do material é determinado pela relação entre as alturas dos picos do difratograma, do pico cristalino em 2θ em cerca de $22-23^\circ$ e da região amorfa em 2θ em torno de $18-19^\circ$, utilizando o método de Segal (1959).

4.5.3- Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e Potencial Zeta

Alíquotas das suspensões de nanocelulose após a ultrassonicação foram caracterizadas quanto ao diâmetro de partículas e quanto a presença de cargas superficiais, usando um equipamento analisador de tamanho de partículas e de Potencial Zeta DelsaNano C, da Beckman Coulter. As partículas foram analisadas em uma faixa de 0,6 nm a 7 μm nas seguintes condições: índice de refração da água igual a 1,3328; viscosidade de 0,8878 mPa.s; ângulo de 15° e temperatura de 25°C . Os resultados obtidos foram uma média de 3 medidas para cada amostra.

4.5.4- Análise Termogravimétrica (TGA)

As estabilidades térmicas dos filmes foram avaliadas em um Shimadzu DTG-60H. Aproximadamente 8 mg das amostras foram colocadas em um porta-amostra de alumina e aquecidas de 25 até 600°C a uma razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera de nitrogênio (N_2) com fluxo de 30 ml min^{-1} .

4.5.5- Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das partículas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. Para esse efeito, foi utilizado um microscópio Zeiss Supra 35VP com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (FEG-SEM) trabalhando a 30 kV. Para tanto as nanopartículas de sílica foram dispersas em acetona (1%, m/m) em um banho ultrasônico por 15 min e posteriormente uma alíquota de cada suspensão foi depositada sobre um substrato de silício.

4.5.6- Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia das partículas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura da marca Jeol, JEM-2100, equipado com EDS, Thermo scientific. As nanoceluloses liofilizadas foram resuspensas em água para concentração ao redor de 0,01% e sonicadas por 5 minutos, logo em seguida, uma gota dessas suspensões foi depositada em grades de transmissão de cobre recobertas com Formvar, contrastadas por imersão em uma solução de acetato de uranila 2% e secas na capela sob temperatura ambiente. As amostras foram observadas em 80 kV. As dimensões das nanoceluloses foram determinadas usando o software Image J como processador de imagens.

5- Resultados e Discussão

5.1- Desmedulamento do bagaço de cana-de-açúcar

O processo de desmedulamento foi realizado para separar a fração medula da fração fibra, material de estudo deste trabalho. Os resultados estão mostrados na tabela 3.

Apesar dos resultados expressos na tabela 3 não estarem dentro do intervalo publicado por ICIDCA (1990), os valores obtidos foram satisfatórios, pois, o objetivo de enriquecer a fração fibra foi alcançado, como demonstrado na Figura 10.

Tabela 3. Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar.

Componentes	(%) obtidas	(%) (ICIDCA, 1990)
Fibra	65	55,0-60,0
Medula	27	30,0-35,0
Solúveis	8	10,0-15,0

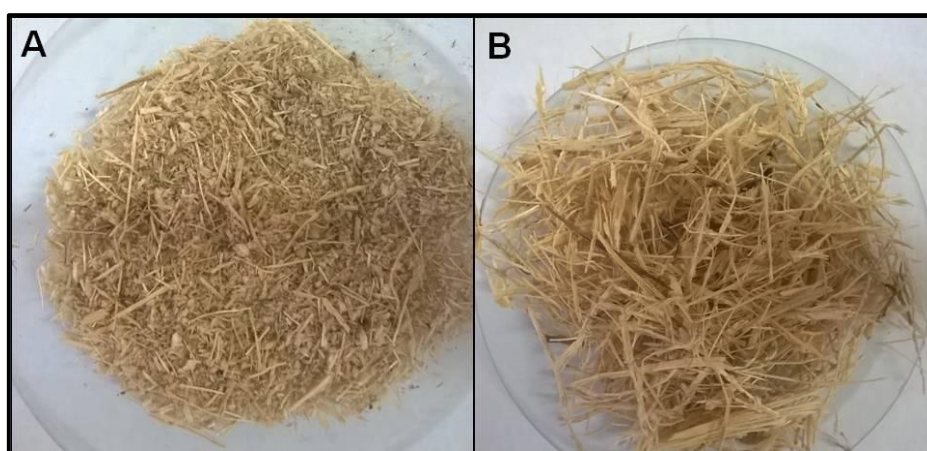


Figura 10. Fração rica em medula (A); fração rica em fibra (B).

Para as etapas posteriores, polpação e hidrólise ácida foi empregado como matéria-prima a fração fibra, por representar a maior fração constituinte da biomassa e por apresentar fibrilas lineares com mais regiões cristalinas.

5.2- Composição Química do Bagaço de Cana-de-açúcar

Os resultados da composição química da fibra de bagaço obtido estão apresentados na tabela 4. Os valores encontrados experimentalmente de todos os componentes (extrativos, holocelulose e cinzas), com exceção da lignina, encontram-se próximos da faixa de valores publicados pelo ICIDCA (1990), Esta faixa é ampla e os valores são fundamentalmente dependentes, por exemplo, da variedade da cana, localização geográfica ou mesmo do tempo de cultivo.

O valor de lignina presente na fibra do bagaço de cana-de-açúcar foi superior ao descrito pela literatura para bagaço de cana. Estando mais próximo de madeiras moles (*Softwood*) do que de madeiras duras (*Hardwood*) com valores de 28,6% e 22,7%, respectivamente (FENGUEL; WEGENER, 1984). Os valores de ligninas totais presentes excluem os valores de cinzas nas amostras determinadas.

Tabela 4. Composição química da fração fibra do bagaço de cana-de-açúcar.

Componentes	Teores obtidos (%)	Teores da literatura (%) (ICIDCA, 1990)
Extrativos em cicloexano/etanol	6,9	5,8 – 14,8
Cinzas	2,2	2,0 – 3,0
Lignina Klason total	26,7	18,0 – 23,0
Holocelulose	66,2	66,0 – 74,0

A extração com mistura de solventes orgânicos (cicloexano/etanol) (1:1, v/v) possibilitou a remoção de compostos orgânicos chamados de extrativos. A remoção destes extrativos é necessária, pois eles podem exercer vários tipos de influência nos experimentos, sendo que os extrativos podem reagir com agentes químicos, fazendo com que o consumo de reagentes seja maior, portanto todas as reações posteriores foram realizadas com a fibra extraída e seca.

5.3- Rendimento da polpação da fibra do bagaço de cana-de-açúcar

O que se deseja em um processo de polpação é uma polpa rica em celulose, ou idealmente só celulose. Como o teor de celulose no bagaço é aproximadamente de 50%, o rendimento desejável de polpa seria de 50%, com teores muito baixos de lignina residuais e de polioses.

Neste trabalho, utilizou-se a polpação soda com branqueamento de clorito de sódio, objetivando uma polpa celulósica com alto teor de celulose e baixo teor de lignina. O rendimento da polpa obtida foi de 50,89%, este valor está bem próximo ao desejado (50%) e acima dos 47% obtido por Triana e colaboradores (1990). A Figura 11 mostra a fibra do bagaço de cana-de-açúcar

antes e após a polpação, ambas trituradas a 35 Mesh. Observa-se fibras mais branca e finas, indicando que houve remoção de grande parte da lignina.

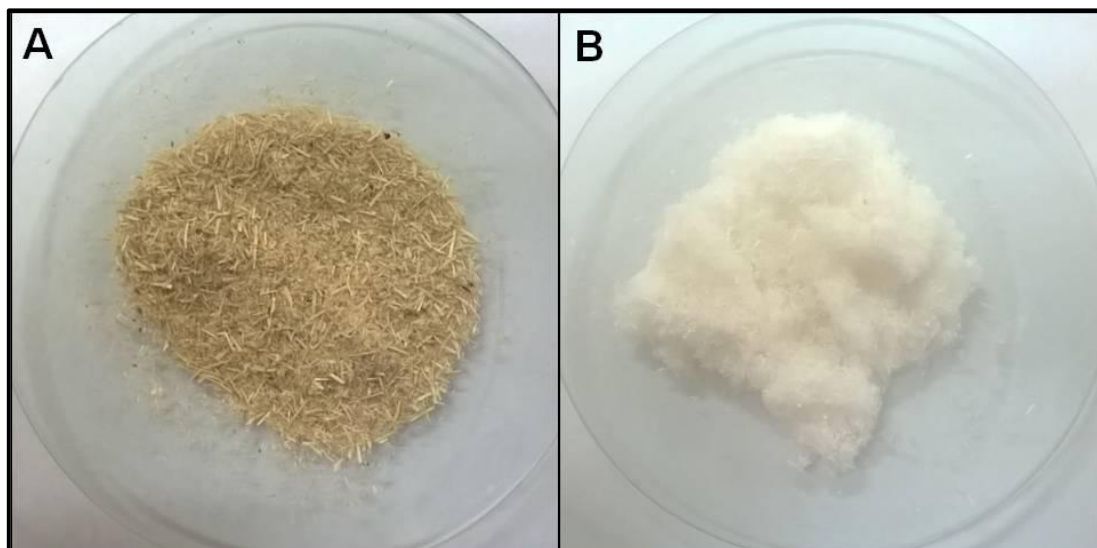


Figura 11. Fibra do bagaço de cana triturada 35 Mesh (A); B: Celulose obtida da fibra do bagaço de cana após branqueamento com clorito.

5.4. Estudo exploratório para obtenção dos nanocristais de celulose.

Foram realizadas medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), com o objetivo de analisar a morfologia e dimensão dos nanocristais resultantes dos testes exploratórios, as imagens estão apresentadas nas Figuras 12 e 13.

A amostra apresentou bastões com comprimentos entre 50-150 μm de comprimento e 3,5-30 μm de largura, demonstrando que a hidrólise das fibras deveria ser mais agressiva para uma hidrólise mais efetiva. Nas imagens de MEV, mostradas na Figura 12, notam-se vários macrocomponentes envolvendo as fibras de celulose. Possivelmente, o aparecimento de fissuras pela dissolução da hemicelulose foi provocado pelo processo de ataque químico às fibras (PEREIRA *et al.*, 2010).

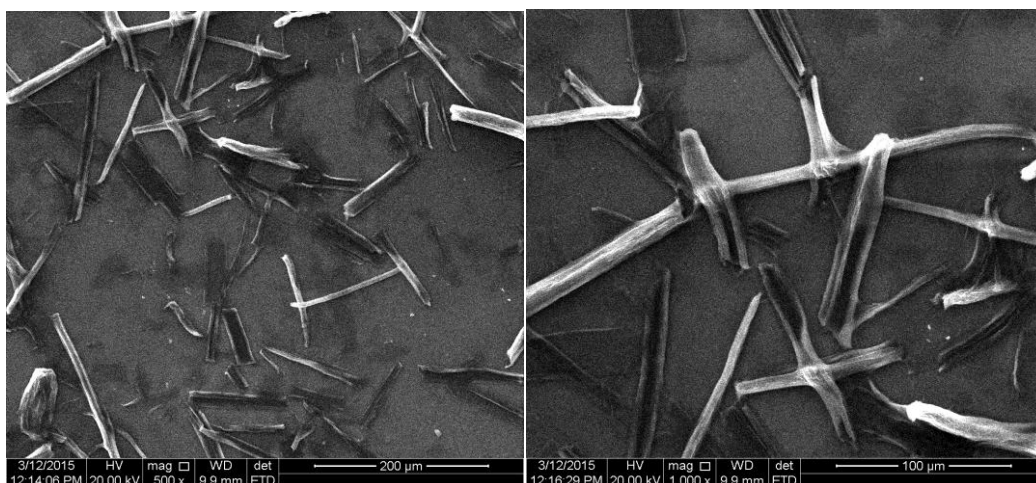


Figura 12. Imagens de MEV da amostra de celulose submetida à condição de 6 mol L⁻¹, temperatura de 45 °C e 180 min.

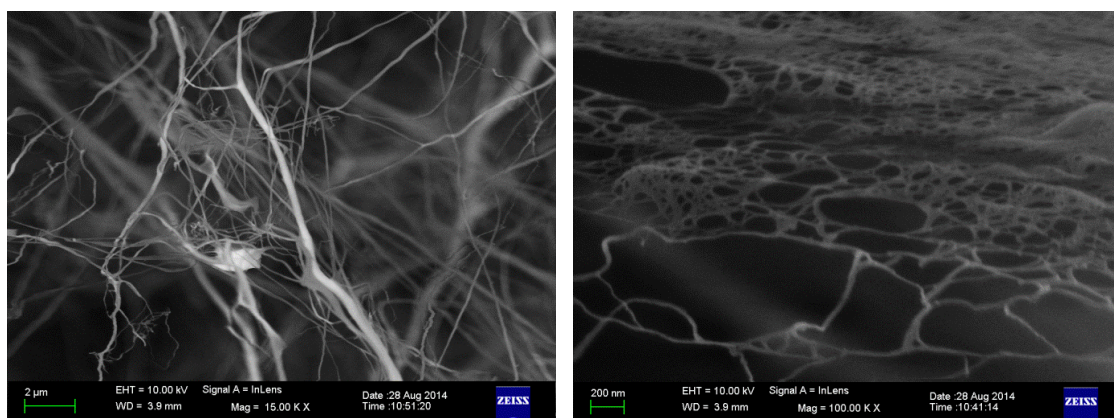


Figura 13. Imagens de MEV da amostra de celulose submetida a condição de 9,2 mol.L⁻¹, temperatura ambiente e 75 min.

A partir das imagens de MEV, pode-se observar que foram obtidas nanoceluloses, com diâmetro médio de 30 nm, para a condição de ácido sulfúrico mais concentrado (9,2 mol L⁻¹).

5.5. Obtenção e caracterização de nanocristais de celulose da fibra do bagaço de cana-de-açúcar

A celulose purificada foi submetida à hidrólise ácida com H₂SO₄ a 11,5 e 9,6 mol L⁻¹, diferentes temperaturas e variação de tempo, visando a quebra das ligações intermoleculares e isolamento dos nanocristais de celulose.

Entre os vários métodos para a preparação de nanocelulose, a hidrólise ácida é a mais conhecida e utilizada (PENG *et al.*, 2011). Esse processo quebra as partes desordenadas e amorfas da celulose, liberando cristais individuais bem definidos. Este processo é baseado na cinética de hidrólise mais rápida nas regiões amorfas, em comparação com as cristalinas (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010; PENG *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2011). A Figura 14 mostra as nanoceluloses obtidas após a liofilização das suspensões coloidais.

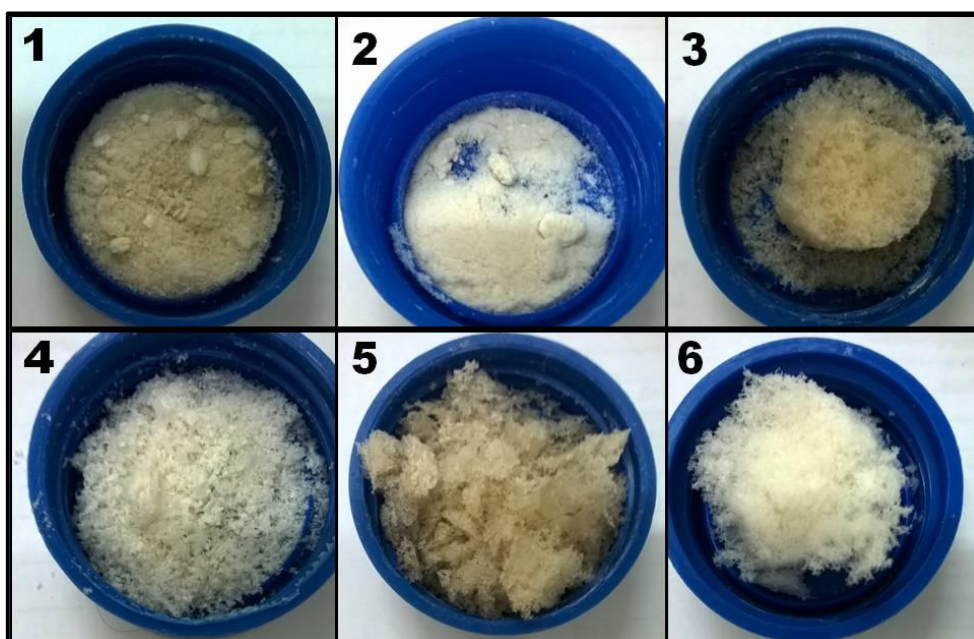


Figura 14. Fotos das nanoceluloses (NC) obtidas liofilizadas. 1: Nanocelulose extraída com H_2SO_4 60% por 30 min; 2: Nanocelulose extraída a com H_2SO_4 60% por 1 h; 3: Nanocelulose extraída com H_2SO_4 50% por 1 h; 4: Nanocelulose extraída com H_2SO_4 50% por 2 h; 5: Nanocelulose extraída com H_2SO_4 50% por 3 h; 6: Nanocelulose extraída a com H_2SO_4 50% por 4 h.

5.4.1- Espectroscopia no Infravermelho das nanoceluloses (IV)

Nas Figuras 15 e 16 estão apresentados os espectros no IV para a celulose, a fibra do bagaço de cana-de-açúcar e nanoceluloses obtidas sob diferentes condições de hidrólise ácida.

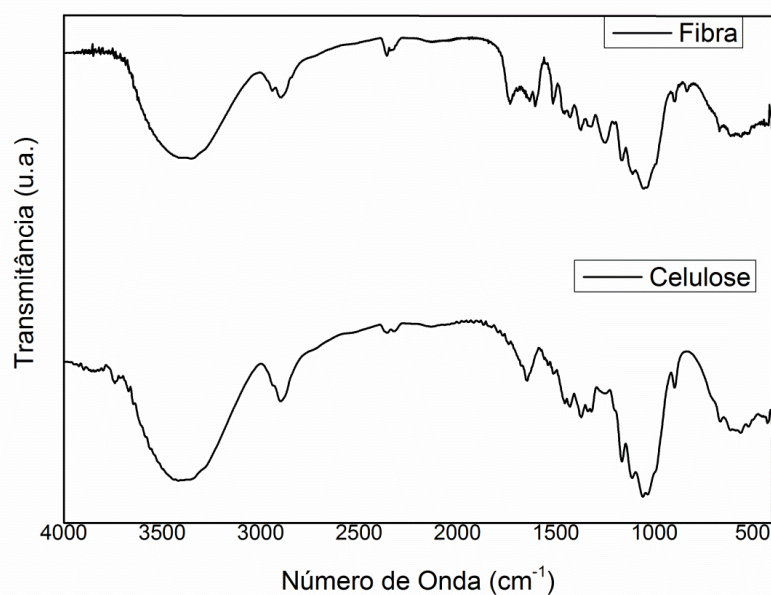


Figura 15. Espectros no infravermelho da fração fibra do bagaço de cana-de-açúcar e da celulose, obtidas neste trabalho.

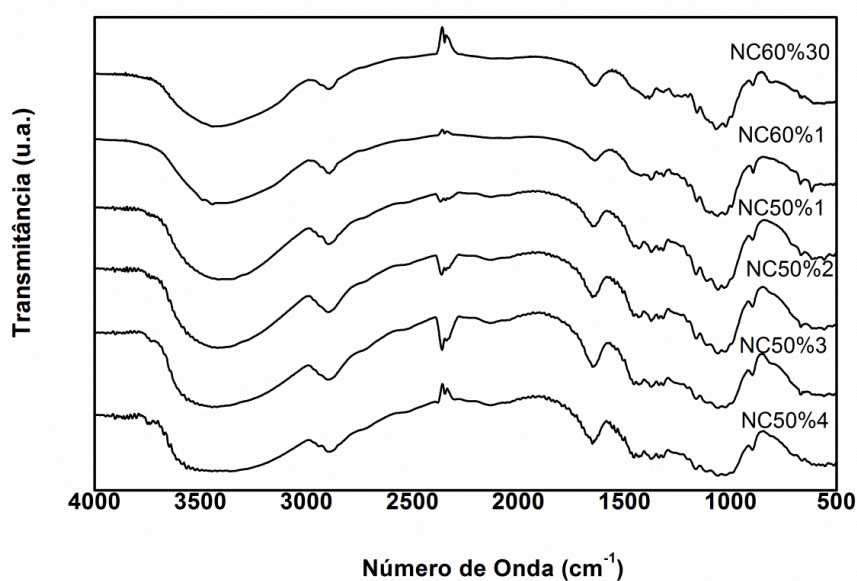


Figura 16. Espectros no infravermelho relativos às nanoceluloses (NC) obtidas neste trabalho. NC60%30 - H₂SO₄ 60% por 30 min; NC60%1 - H₂SO₄ 60% por 1 h; NC50%1 - H₂SO₄ 50% por 1 h; NC50%2 - H₂SO₄ 50% por 2 h; NC50%3 - H₂SO₄ 50% por 3 h; NC50%4 - H₂SO₄ 50% por 4 h.

Para facilitar o entendimento dos espectros das figuras 15 e 16 e identificar as principais frequências de absorção das fibras lignocelulósicas, foi

construída a Tabela 5 (Alemdar; Sain, 2008; Lu; Hsieh, 2010; Mandal; Chakrabarty, 2011; Sain; Panthapulakkal, 2006; Sun *et al.*, 2005).

A presença de hemicelulose e ligninas podem ser observadas nas fibras por meio do pico em 1730 cm^{-1} (Figura 15), atribuído ao estiramento da ligação C=O de grupos acetil, urônico e éster de derivados dos ácidos ferúlico e p-cumárico da lignina e/ou hemiceluloses (SAIN; PANTHAPULAKKAL, 2006; SUN *et al.*, 2005). A ausência deste pico nos espectros da Figura 16 indica a remoção de hemiceluloses e lignina, relacionada com a purificação e a hidrólise ácida utilizada.

Também pode ser observada a banda em cerca de 1647 cm^{-1} , referente a deformação angular do grupo OH da água presente na celulose (MANDAL; CHAKRABARTY, 2011). Esta banda esta presente em todas as amostras.

Tabela 5. Principais vibrações observadas para fibras (Alemdar; Sain, 2008; Lu; Hsieh, 2010; Mandal; Chakrabarty, 2011; Sain; Panthapulakkal, 2006; Sun *et al.*, 2005).

Comprimento de onda (cm^{-1})	Tipo de vibração
3500-3200	Estiramento da ligação O-H da celulose/água absorvida.
2868- 2970	Estiramento assimétrico da ligação C-H, presente na celulose e hemicelulose.
1730-1737	Estiramento da ligação C=O do grupo acetil ou ligações éster do grupo carboxílico da hemicelulose.
1650-1620	Deformação angular do grupo OH da celulose/água absorvida.
1430-1420	Deformação angular simétrica do grupo CH_2 e deformação angular da ligação C-O e C-H presente em polissacarídeos.
1028-1161	Estiramento da ligação C-O e deformação angular da ligação C-H.
895-902	Ligações β -glicosídicas entre unidades de glicose da celulose e/ou deformação angular da ligação C-H.

O pico fino e pequeno (em algumas amostras como ombro) próximo à 1205 cm^{-1} está relacionado com a vibração S=O devido à esterificação da celulose como relatado por Lu e Hsieh (2010). Os picos em 1061 e 897 cm^{-1} estão associados com os estiramentos C-O e C-H da celulose (ALEMDAR; SAIN, 2008), estes picos apareceram em todos os espectros. As diferenças nos espectros sugerem que as amostras possuem um teor de celulose muito

alto. Além disso, segundo Benini (2015) a presença da banda próxima à 897 cm^{-1} nos espectros das nanoceluloses pode indicar que não houve perda de material celulósico durante a hidrólise ácida. Em todos os espectros das nanocelulose obtidos nas diferentes condições de hidrólise ácida realizadas não foram observadas mudanças nesta banda.

5.4.2- Distribuição do tamanho das nanoceluloses obtidas

Como se espera que as nanoceluloses possuam uma morfologia alongada², os valores que serão discutidos são aproximações dos valores reais, e são importantes para comparação entre as diferentes amostras (FRONE *et al.*, 2011). Além disso, os valores obtidos por DLS geralmente são maiores que os valores reais e/ou obtidos por microscopia. Esta diferença ocorre porque o DLS mede o diâmetro hidrodinâmico das partículas em suspensão. Por serem altamente hidrofílicas e se agregarem rapidamente em suspensão, fornecem valores maiores (ZHOU *et al.*, 2012).

Os gráficos da distribuição do diâmetro das partículas de nanocelulose em suspensão aquosa, pela intensidade de sinal e pelo número de partículas, estão apresentados nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

Segundo Benini (2015) a distribuição considerando a intensidade do sinal fornece informações da amostra como um todo e é obtida diretamente a partir das medidas realizadas pelo equipamento. Por outro lado, o gráfico de distribuição de tamanho pelo número, é derivado dos dados de intensidade e é utilizado para estimar a quantidade relativa de material em cada pico separadamente, sendo que os valores de diâmetro são menos confiáveis.

Considerando os valores de acordo com a intensidade de sinal, Figura 17, é possível observar que as suspensões obtidas para a amostra NC60%30, NC60%1 e NC50%1 apresentaram uma distribuição bi-modal. Para as amostras NC50%2, NC50%3 e NC50%4 apresentam apenas um pico bem alargado, indicando amostras heterogêneas. De todas as amostras estudadas a que apresenta a população mais expressiva, com intensidade máxima de

² As microscopias de varredura e transmissão foram as técnicas utilizadas para confirmação.

aproximadamente 12%, em menor diâmetro, dimensão média de 160 nm, foi a amostra NC60%1.

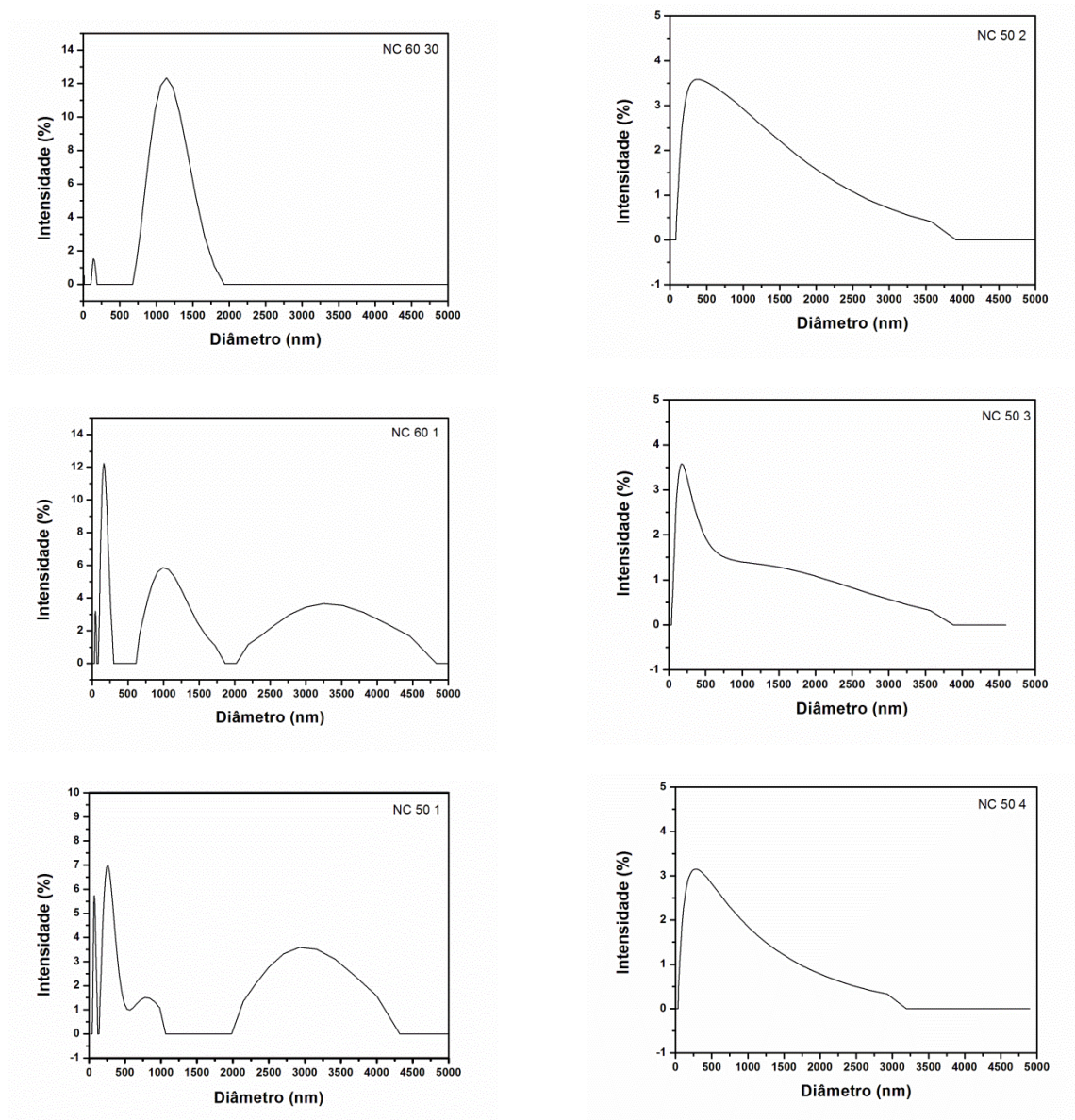


Figura 17. Distribuição do tamanho das partículas de nanocelulose (NC) pela intensidade de sinal. NC 60 30 - H₂SO₄ 60% por 30 min; NC 60 1 - H₂SO₄ 60% por 1 h; NC 50 1 - H₂SO₄ 50% por 1 h; NC 50 2 - H₂SO₄ 50% por 2 h; NC 50 3 - H₂SO₄ 50% por 3 h; NC 50 4 - H₂SO₄ 50% por 4 h.

Considerando a distribuição por número (Figura 18), para as partículas obtidas nos experimentos: NC60%30 os tamanhos da nanopartículas estão no intervalo entre 102 nm e 187 nm; as NC60%1 entre 70 nm e 102 nm; as

NC50%1 entre 140 nm e 1000 nm; as NC50%2 entre 78 nm e 307 nm; as NC50%3 entre 35 nm e 139 nm; e as NC50%4 entre 33 nm e 133 nm.

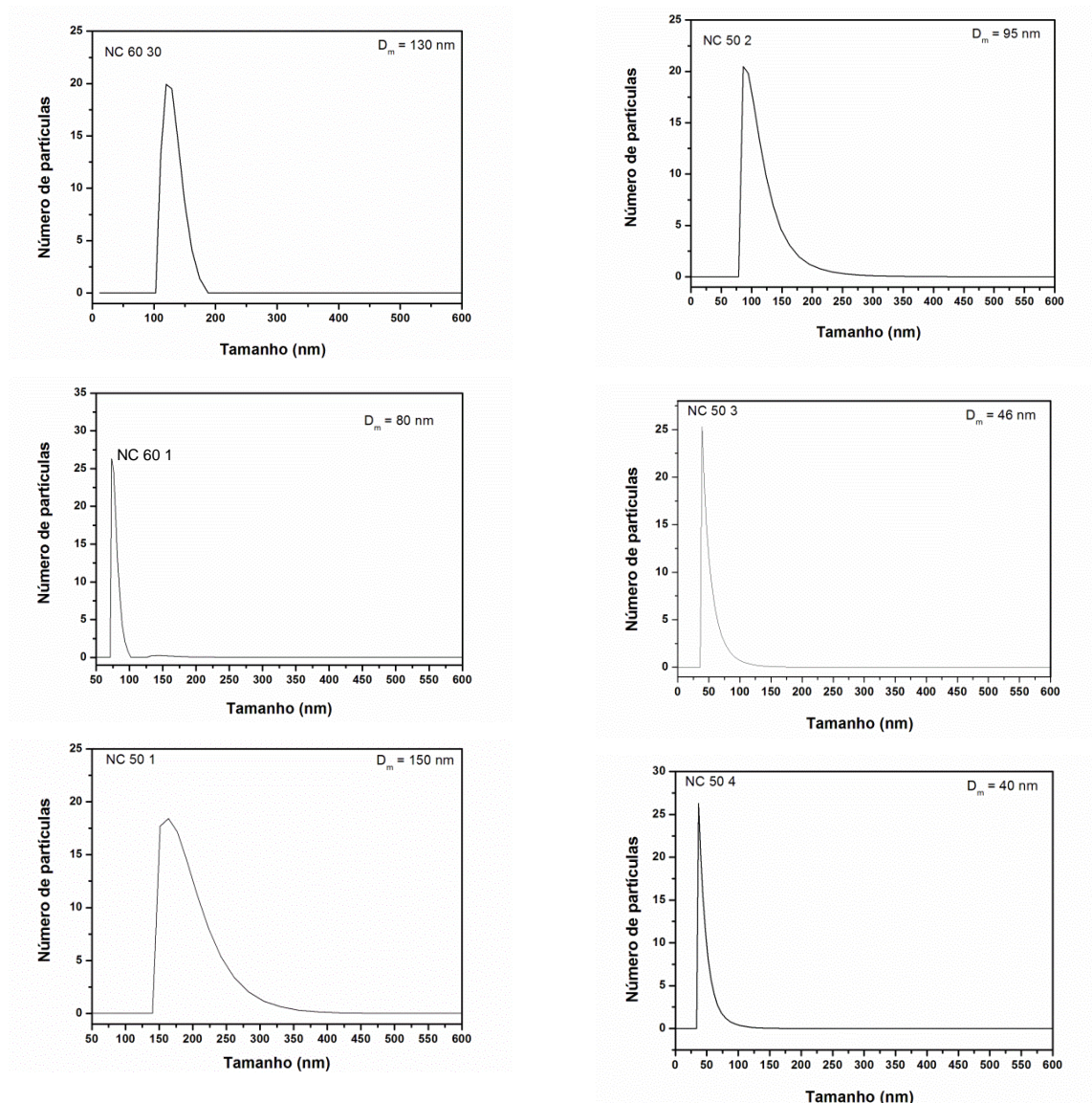


Figura 18. Distribuição do tamanho das partículas de NC pelo número de partículas. NC 60 30 - H₂SO₄ 60% por 30 min; NC 60 1 - H₂SO₄ 60% por 1 h; NC 50 1 - H₂SO₄ 50% por 1 h; NC 50 2 - H₂SO₄ 50% por 2 h; NC 50 3 - H₂SO₄ 50% por 3 h; NC 50 4 - H₂SO₄ 50% por 4 h.

Considerando os intervalos de tamanho apresentados na Figura 18, tem-se que a distribuição do diâmetro hidrodinâmico das partículas, em relação ao número, na amostra NC50%1 apresentou a maior dispersão de tamanho.

Analisando os resultados em relação às condições de hidrólise utilizada em cada experimento, pode se observar que as amostras onde foram utilizadas

a maior concentração de ácido sulfúrico (NC50%4 e NC60%1) apresentaram maior homogeneidade.

5.4.3- Potencial Zeta das suspensões de nanoceluloses

A hidrólise com ácido sulfúrico envolve a introdução de grupos sulfatos na superfície dos nanocristais de celulose, que os carregam negativamente provocando uma estabilização aniônica por forças de repulsão, levando assim à obtenção de dispersões aquosas estáveis (BECK-CANDANEDO; ROMAN; GRAY, 2005; LIMA; BORSALI, 2004; SILVA; D'ALMEIDA, 2009). O potencial Zeta está diretamente relacionado com a carga na superfície e fornece um indicativo da efetividade da hidrólise. Além disso, sabe-se que um aumento no tempo de extração em maior teor de sulfato nanocristais (FLAUZINO NETO *et al.*, 2013; ROMAN; WINTER, 2004).

Os resultados do potencial Zeta para as suspensões obtidas nos experimentos de extração das nanocelulose do bagaço de cana-de-açúcar estão apresentados na Tabela 6. Pode se observar que as suspensões caracterizadas apresentaram valores de potencial Zeta próximos a -30 mV, significando boa estabilidade da suspensão coloidal. De acordo com Zhou et al. (2012), os valores menores que carga superficial de cerca de -15 mV representam início de aglomeração e valores de carga maiores que -30 mV (em módulo) significam que existe repulsão mútua suficiente, resultando em uma estabilidade coloidal.

Os valores de potencial Zeta obtidos são próximos dos valores obtidos para *whiskers* de celulose obtidos do algodão e do capim-sapê (TEIXEIRA *et al.*, 2010); BENINI, 2015), respectivamente.

Tabela 6. Potencial Zeta das melhores suspensões obtidas nos experimentos de extração das nanoceluloses.

Amostra	Potencial Zeta (mV)
NC60%30	-32.47
NC60%1	-34,51
NC50%1	-34.87

NC50%2	-27.58
NC50%3	-34.14
NC50%4	-32,83

NC60%30 - H₂SO₄ 60% por 30 min; NC60%1 - H₂SO₄ 60% por 1 h; NC50%1 - H₂SO₄ 50% por 1 h;
NC50%2 - H₂SO₄ 50% por 2 h; NC50%3 - H₂SO₄ 50% por 3 h; NC50%4 - H₂SO₄ 50% por 4 h.

Estes resultados indicam a incorporação de grupos sulfato nas nanoceluloses após tratamento com ácido sulfúrico e também que ambas as condições de hidrólise utilizadas conduziram a obtenção de suspensões aquosas homogêneas e estáveis.

Segundo Benini (2015) a concentração do ácido e o tempo de hidrólise interferem nas dimensões e na estabilidade das suspensões de nanocelulose, mais do que os outros parâmetros, uma vez que estas propriedades estão diretamente relacionadas com a efetividade do ataque do ácido as regiões amorfas da celulose e substituição das hidroxilas por grupos sulfatos. Portanto esperava-se que um aumento no tempo de extração resultasse em nanoceluloses com maior sulfatação, contudo a carga de superfície foi maior para NC50%1 do que para NC50%2. Provavelmente, a pequena diferença observada está associada ao tempo de diálise, uma vez que a diálise promove a desulfatação sobre as superfícies dos nanocristais (WANG *et al.*, 2007). A presença de grupos sulfato também foi confirmada pela análise de FTIR, como mostrado na Figura 17 anteriormente.

5.4.4- Difração de Raios X da fibra purificada e das nanoceluloses

Nas microfibrilas, as moléculas de celulose formam regiões cristalinas intercaladas com regiões amorfas, sendo que a estrutura cristalina original, denominada celulose I, pode ser afetada pelo tratamento químico. O reordenamento das moléculas pode gerar outros três tipos de estruturas cristalinas denominadas celulose II, celulose III e celulose IV. A celulose II é obtida diretamente pela conversão da celulose I, quando tratada com solução de NaOH em um processo de mercerização, ou ainda por um processo de dissolução de qualquer forma polimórfica da celulose, seguido de

recristalização. A celulose III é obtida pelo tratamento da celulose I com amônia líquida e a celulose IV, pelo tratamento térmico (≥ 200 °C), também da celulose I.

Os padrões de difração de raios X da celulose branqueada e das nanoceluloses obtidas são mostrados na Figura 19. Esses padrões de difração são típicos de materiais semicristalinos, apresentando um halo amorfo e amplo e picos cristalinos. A partir dos difratogramas foram calculados os índices de cristalinidade (IC) e o diâmetro dos cristalitos de cada amostra e são mostrados na tabela 7. O tamanho do cristalito (L) é um indicativo da rigidez do material e varia de acordo com o teor de celulose (WADA; OKANO, 2001).

Tabela 7. Índices de cristalinidade (IC) e o diâmetro dos cristalitos das amostras estudadas.

Amostra	Índice	
	Cristalinidade (%)	Diâmetro dos cristalitos (nm)
Celulose	61	2,7
NC60%30	64	2,8
NC60%1	80	3,9
NC50%1	67	4,1
NC50%2	63	2,2
NC50%3	73	3,8
NC50%4	62	2,7

NC60%30 - H₂SO₄ 60% por 30 min; NC60%1 - H₂SO₄ 60% por 1 h; NC50%1 - H₂SO₄ 50% por 1 h; NC50%2 - H₂SO₄ 50% por 2 h; NC50%3 - H₂SO₄ 50% por 3 h; NC50%4 - H₂SO₄ 50% por 4 h.

Para calcular o tamanho dos cristalitos utilizou-se a equação de Scherrer:

$$L = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (3)$$

onde: (L) é o tamanho do cristalito; (K) é a constante de proporcionalidade (a constant de Scherrer, K= 0.9); (λ) é o comprimento de onda da radiação do raios X CuK α ($\lambda = 1.5406$ Å); (β) é a largura a meia-altura do pico de difração

(FWHM, Peak width in Full Width at Half Maximum); (θ) é o ângulo de difração (SCHERRER, 1918; LANGFORD, WILSON, 1978).

Pode ser observado na Figura 19 que todos os difratogramas apresentam os picos em 2θ em cerca de 16° referente a difração dos planos 110 e 101 sobrepostos. O pico em 2θ em cerca de 22° referente a difração do plano (200), característicos da celulose tipo I (OH *et al.*, 2005). O aparecimento de um pico de difração em 2θ em cerca de 12° , sendo observado na nanocelulose obtida na condição com maior concentração de ácido, indica a presença de celulose tipo II. Portanto a condição NC60%1 exibe uma mistura de polimorfos de celulose I e II. Possivelmente, a presença de celulose tipo II está associada à regeneração da celulose depois da hidrólise, uma vez que uma solução de ácido sulfúrico 60% (v/v) pode ser um solvente para a celulose (O'SULLIVAN, 1997).

O grau de cristalinidade de uma amostra de celulose pode variar em função do processo empregado, uma vez que pode ocorrer solubilização seguida de recristalização, ou mesmo perda da região amorfa, uma vez que esta oferece melhores condições de acessibilidade aos reagentes empregados. A agressividade dos processos que utilizam temperaturas altas e grandes tempos é consequência de vários fatores, o que favorece a degradação dos polissacarídeos e consequentemente degradação das fibras (FLAUZINO NETO *et al.*, 2013).

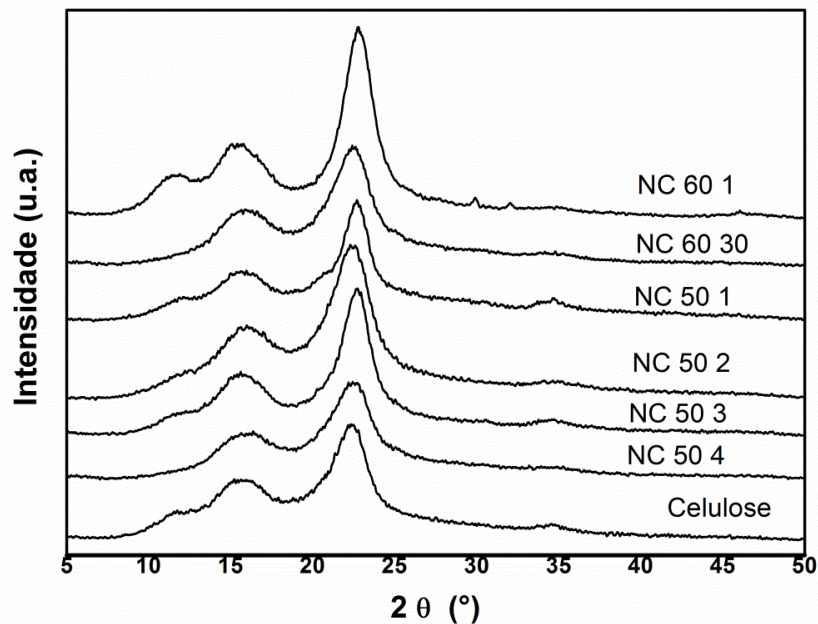


Figura 19. Difrátogramas obtidos para as amostras celulose e NC. NC 60 30 - H₂SO₄ 60% por 30 min; NC 60 1 - H₂SO₄ 60% por 1 h; NC 50 1 - H₂SO₄ 50% por 1 h; NC 50 2 - H₂SO₄ 50% por 2 h; NC 50 3 - H₂SO₄ 50% por 3 h; NC 50 4 - H₂SO₄ 50% por 4 h.

No trabalho de Rosa et al. (2010), o tempo de hidrólise afetou o grau de cristalinidade, sendo que amostras hidrolisadas por 120 min apresentaram o maior índice de cristalinidade (65,9%). Por outro lado, em tempos maiores, 150 e 180 min, as amostras apresentaram uma redução da cristalinidade para 62,2 e 62,5%, respectivamente. Segundo os autores isto ocorre, pois, o tempo prolongado de hidrólise remove os domínios amorfos e também destrói parcialmente os domínios cristalinos.

O aumento do índice de cristalinidade das amostras de nanocelulose em relação a fibra branqueada ocorreu devido à remoção dos domínios amorfos durante a hidrólise ácida. A amostra que apresentou maior índice de cristalinidade foi a NC60%1 com um valor de 80%. Para as amostras extraídas com ácido sulfúrico de concentração de 50%(v/v) há um aumento gradativo da cristalinidade com o decorrer do tempo de hidrólise, mas uma diminuição no IC foi observada na amostra hidrolisada por 4 horas. Isso ocorre, pois, o tempo

prolongado de hidrólise remove os domínios amorfos e também destrói parcialmente os domínios cristalinos (ROSA *et al.*, 2010). Os tamanhos de cristalitos das nanoceluloses foram aproximadamente os mesmos; este comportamento era esperado porque a hidrólise ácida quebra somente as regiões amorfas não agredindo as regiões cristalinas, com exceção de tempos longos de hidrólise.

5.4.5. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) é fundamental na caracterização de materiais poliméricos, pois a estabilidade térmica é crucial, especialmente no uso de nanopartículas de celulose como reforço em polímeros sintéticos termoplásticos, onde são empregadas elevadas temperaturas de processamento (DUFRESNE, 2013). Com a caracterização por termogravimetria foi possível estabelecer as temperaturas de degradação térmica e o efeito da quebra dos cristais de celulose em nanocristais na estabilidade térmica destes materiais. As curvas de TGA e DTG (derivada) das diferentes condições estão apresentadas na Figura 20, e revelam a perda de massa do material quando aquecido.

Nos gráficos de TGA de todas as amostras notam-se três eventos de perda de massa. O primeiro é relacionado à perda da umidade da amostra. Devido às características hidrofílicas da celulose, há uma retenção maior de água na fibra tratada e na nanocelulose, já que as fibras estão mais expostas. O segundo evento é relacionado à pirólise da celulose e da hemicelulose. Como a lignina possui uma alta resistência à pirólise, funciona como um retardante à oxidação devido à estabilidade conferida pelos diversos grupos de aromáticos, fazendo com que a fibra bruta tenha uma menor degradação do que a fibra tratada. O terceiro evento é relativo à pirólise da lignina. Moran e colaboradores (2008) observaram que em atmosfera inerte a hemicelulose e a lignina são os primeiros a se degradar, por volta dos 200 °C, sendo que na lignina o processo de termodegradação persiste 700 °C, enquanto que a hemicelulose pirolisa completamente aos 315 °C. Na celulose os processos de degradação térmica ocorrem entre 315 °C e 400 °C.

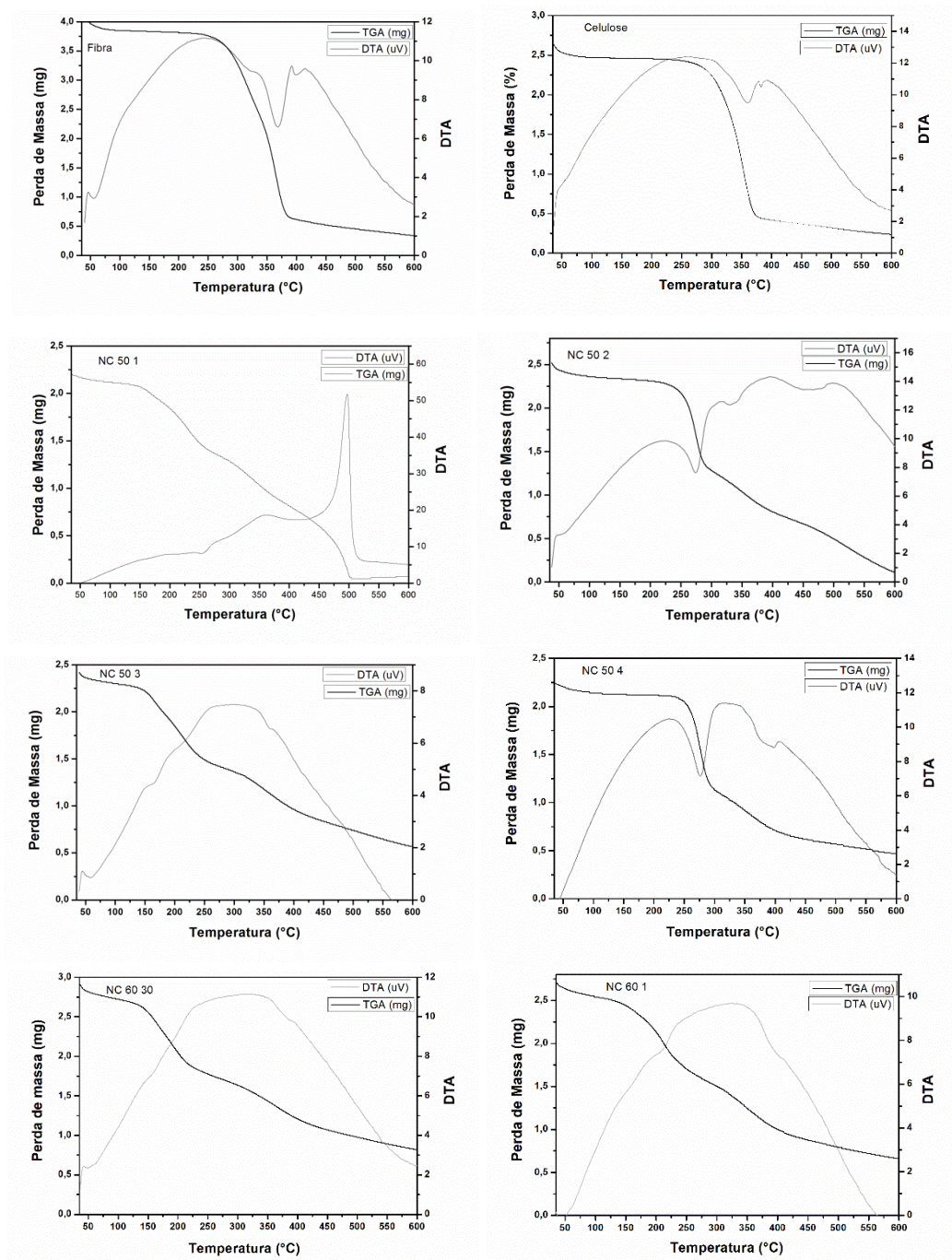


Figura 20. Curvas de TGA e DTG (derivada) das nanoceluloses. NC 60 30 - H_2SO_4 60% por 30 min; NC 60 1 - H_2SO_4 60% por 1 h; NC 50 1 - H_2SO_4 50% por 1 h; NC 50 2 - H_2SO_4 50% por 2 h; NC 50 3 - H_2SO_4 50% por 3 h; NC 50 4 - H_2SO_4 50% por 4 h.

Quanto às nanoceluloses, no segundo evento relativo à degradação da celulose, a substituição dos grupos hidroxila pelos grupos sulfatos ácidos na etapa de hidrólise diminuem a energia de ativação para a degradação da

celulose, tornando a amostra menos resistente à pirólise, ocorrendo reações de desidratação, liberando água e catalisando a sua decomposição (ROSA, *et al.* 2010). Como podem ser observadas na tabela 8, todas as nanoceluloses mostraram temperaturas de degradação máxima ($T_{m\acute{a}x}$) menores que as da fibra e as da celulose.

No terceiro evento, ocorrem às quebras de ligação das moléculas de celulose internas, isto é, que não fizeram contato com o ácido sulfúrico (MORÁN *et al.*, 2008). De acordo com Rosa et al. (2010), o pico observado no gráfico de DTG na amostra de NC tratada com ácido 50% por 1h deve-se à presença de lignina residual do processo de hidrólise, aumentando a estabilidade térmica da nanocelulose.

Na tabela 8 estão mostrados os dados de temperatura de início de degradação (T_{ONSET}), a temperatura do término da degradação (T_{ENDSET}), e a temperatura máxima taxa de degradação (T_{MAX}), onde se encontram os picos dos gráficos de DTG.

Tabela 8. Dados de temperatura de início de degradação (T_{ONSET}), temperatura do término da degradação (T_{ENDSET}) e a temperatura máxima taxa de degradação (T_{MAX}).

Amostra	T_{onset} (°C)	T_{endset} (°C)	$T_{m\acute{a}x}$ (°C)
Fibra	260	396	367
Celulose	271	382	359
NC 60 30	130	450	350
NC 60 1	131	456	210
NC 50 1	140	506	334
NC 50 2	140	494	273
NC 50 3	144	499	213
NC 50 4	146	433	277

NC 60 30 - H₂SO₄ 60% por 30 min; NC 60 1 - H₂SO₄ 60% por 1 h; NC 50 1 - H₂SO₄ 50% por 1 h;
 NC 50 2 - H₂SO₄ 50% por 2 h; NC 50 3 - H₂SO₄ 50% por 3 h; NC 50 4 - H₂SO₄ 50% por 4 h.

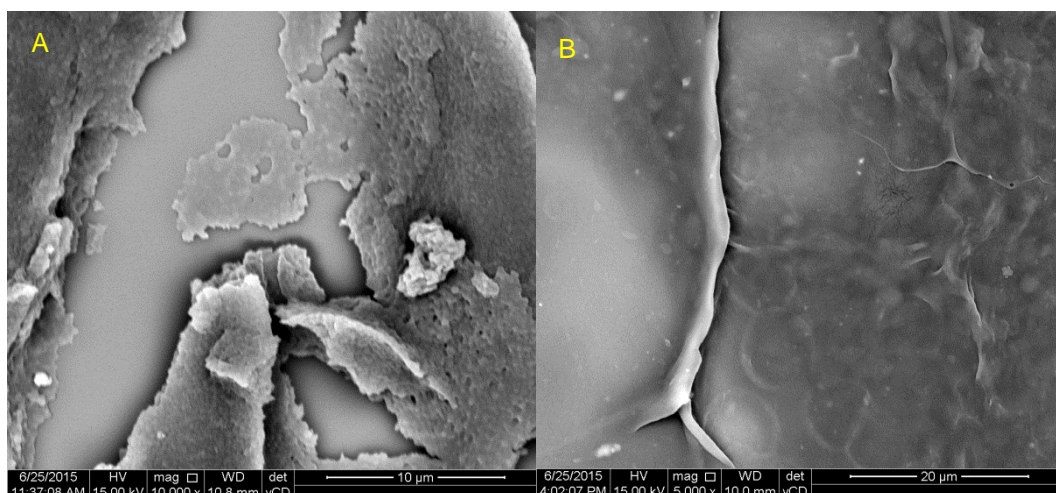
5.4.6- Caracterização morfológica das nanoceluloses

As técnicas de dispersão de luz dependem da interação da luz com o volume hidrodinâmico de uma partícula. Com nanopartículas anisométricas, a resposta varia em função da orientação de cada partícula individualmente. Os dados coletados precisam ser processados para extrair informações. Partículas aciculares, como as nanoceluloses, técnicas de dispersão de luz não conseguiram combinar a precisão da microscopia. A microscopia, por outro lado, fornece imagens diretas de partículas individuais e permite a caracterização de sua morfologia e tamanho (comprimento, largura e espessura).

5.4.6.1- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a caracterização morfológica das nanoceluloses obtidas foram realizadas medidas de MEV, as imagens estão apresentadas na Figura 21.

Observa-se nas imagens de MEV que em todas as condições de preparo das NC houve a formação de um filme sobre o substrato de silício. A presença do filme é perceptível pela presença de regiões craqueladas nas imagens. A formação de filmes caracteriza amostras de celulose com tamanhos reduzidos e impede a observação dos nanocristais de celulose.



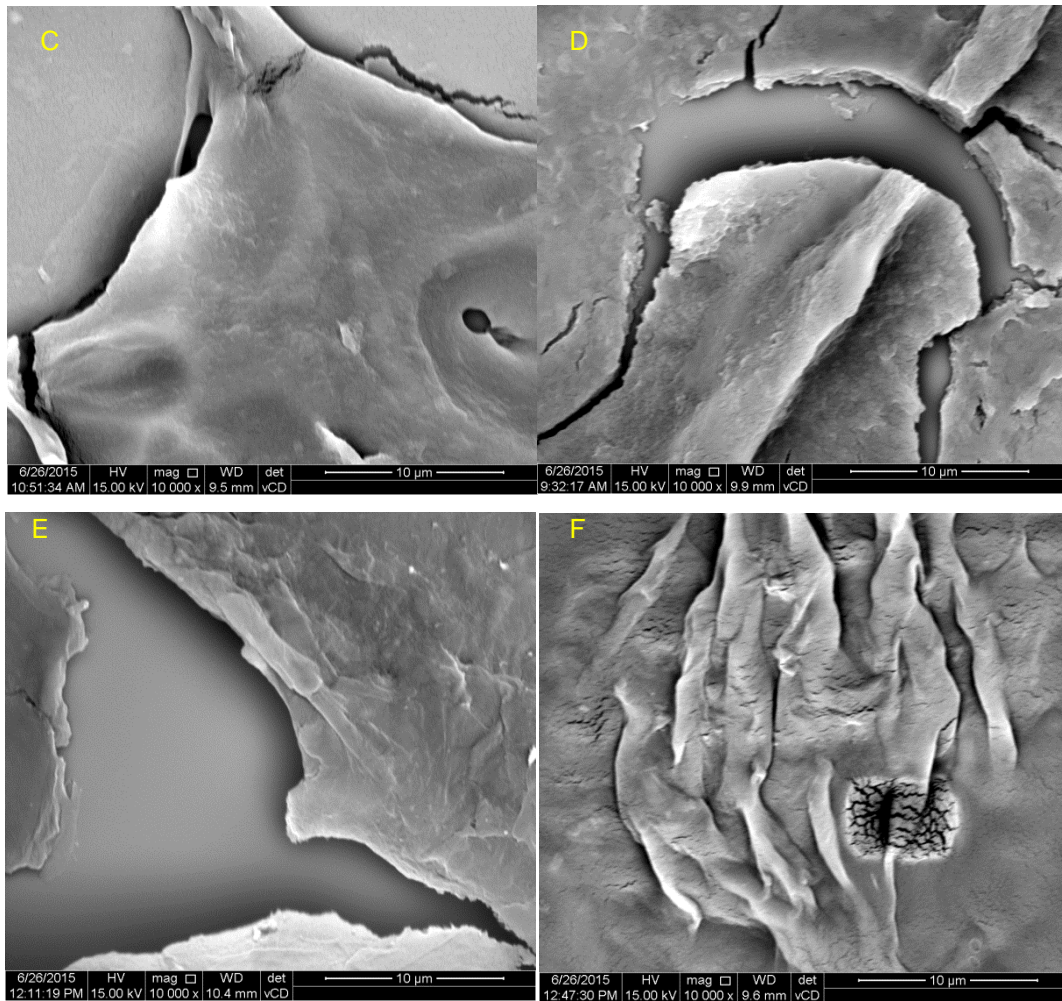


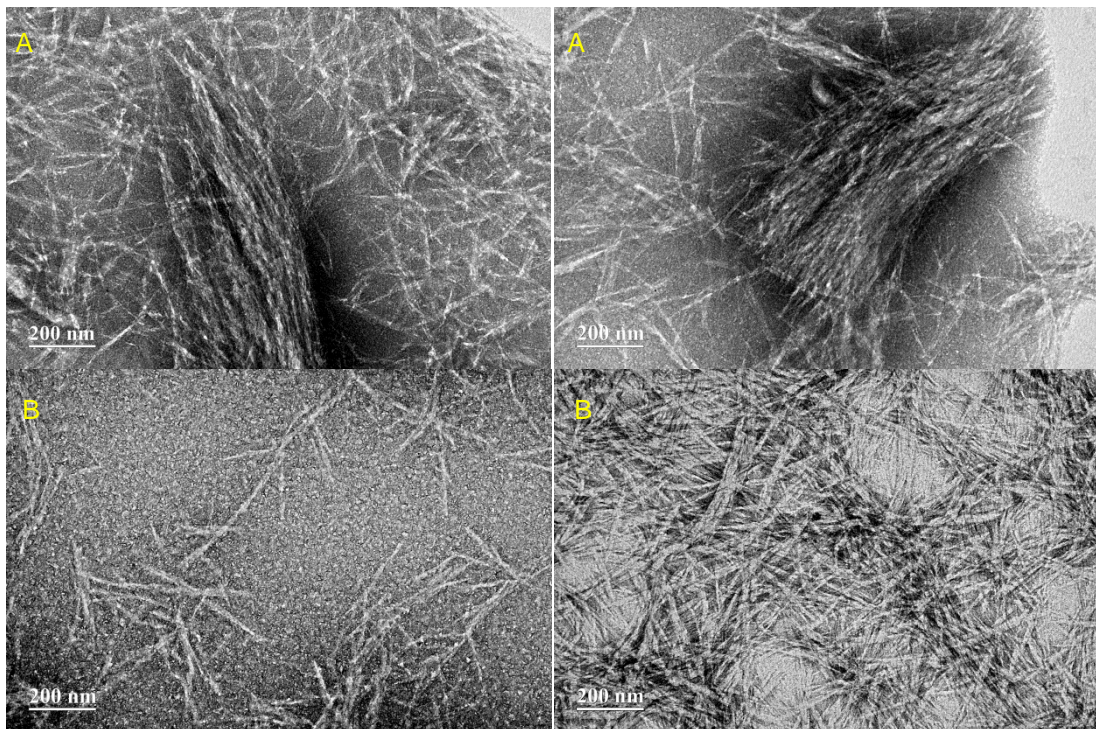
Figura 21. Imagens de MEV das amostras de nanocelulose. A: NC60%30; B: NC60%1; C: NC50%1; D: NC50%2; E: NC50%3; F: NC50%4.

5.4.6.2- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) desempenha um papel de complementar aos dados de espectroscopia de infravermelho e análise de difração de raios X (Kaushik *et al.*, 2015). As imagens MET fornecem uma resolução lateral nanométrica, permitindo visualizar uma grande população de partículas, evitando grandes problemas de amostragem. No entanto, como imagens MET são projeções dos objetos ao longo da direção do feixe incidente, dificultando a medida com precisão a espessura da partícula. Além disso, a baixa densidade das nanoceluloses exige o uso de métodos de

coloração. Várias técnicas podem ser usadas para melhorar o contraste nas imagens, o mais utilizado é chamado de coloração negativa. Uma gota de uma solução aquosa de sais de átomos pesados (acetato de uranilo a 2%) é depositada na amostra. Ao secar, uma fina camada de átomos pesados se concentra em torno das nanopartículas, criando um contorno denso de elétrons (HARRIS, 1997). Os CNC aparecem assim como objetos claros em um fundo escuro, daí o efeito negativo sobre a imagem.

Uma análise morfológica pôde ser obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As amostras de nanocelulose liofilizadas e coradas com acetato de uranila para posterior obtenção das imagens são mostradas nas Figuras 22 e 23. Na Figura 24 são mostrados os histogramas das amostras de nanocelulose obtidos a partir de várias imagens de MET.



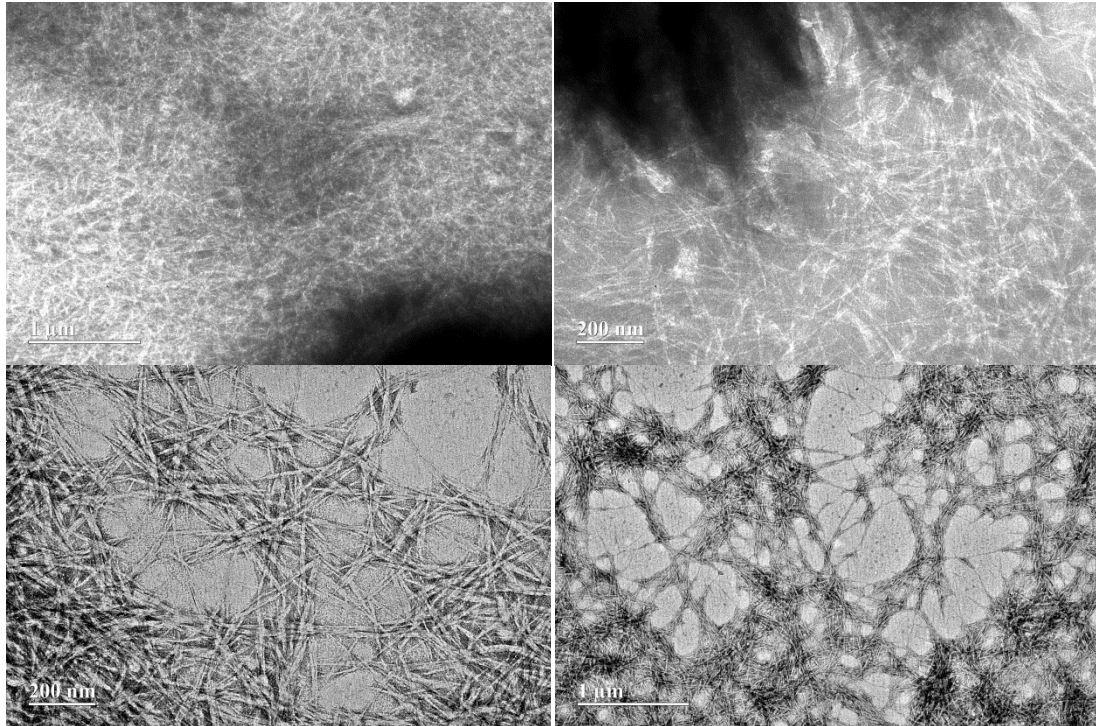


Figura 22. Imagens de MET das amostras de nanocelulose. (A): NC50%1; (B): NC50%2; (C): NC50%3; (D): NC50%4.

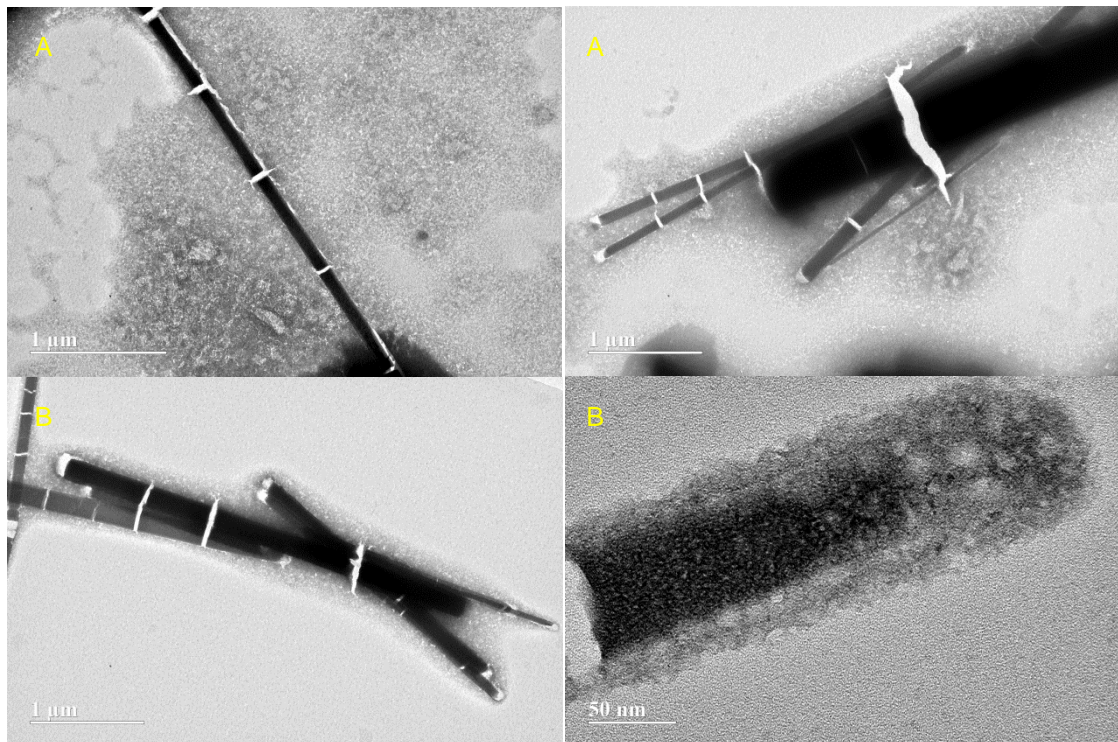


Figura 23. Imagens de MET das amostras de nanocelulose. (A) :NC60%30; (B): NC60%1.

Na Figura 23 A e B observou-se apenas objetos grandes com diâmetro de variando de 100 a 200 nm, com um contraste muito maior do que o esperado para as nanoceluloses. Esta morfologia demonstrou ser um artefato da tela de Formvar que pode ter ocorrido pela dispersão inadequada da amostra e conseqüentemente uma maior pigmentação pelo acetato de uranila (Barth, 2007).

Ao analisarmos as Figuras 22 e 23 observamos que as amostras B (NC50%2: ácido sulfúrico 50%, 45°C por 2 horas) e D (NC50%4: ácido sulfúrico 50%, 45°C por 4 horas) apresentaram homogeneidade nas amostras com diâmetros próximos e todas as imagens apresentam partículas no formato de agulhas. Na amostra A (NC50%1: ácido sulfúrico 50%, 45°C por 1 hora) foi encontrado partículas aglomeradas indicando que o tempo de hidrólise foi curto para quebrar toda a fração amorfa.

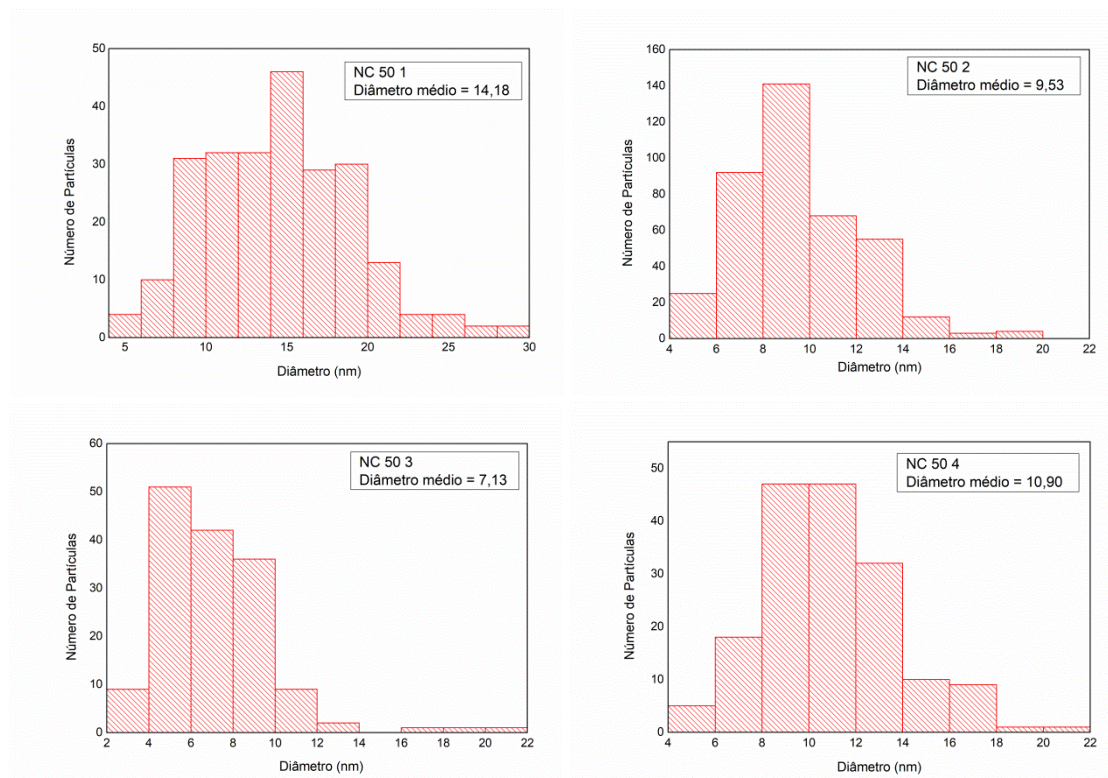


Figura 24. Histogramas da distribuição de tamanho das nanoceluloses obtidos por imagens MET. NC50%1; NC50%2; NC50%3; NC50%4.

6- Conclusão Parcial

O tratamento químico realizado com hidróxido de sódio e clorito de sódio removeram os componentes não celulósicos, resultando em fibras com um baixo teor de lignina e um elevado teor de celulose. Demonstrando que a fibra do bagaço de cana-de-açúcar pode ser usada como fonte de celulose para obtenção de nanocelulose.

A concentração do ácido foi a variável de maior efeito na obtenção de nanoceluloses que combinassem o tamanho reduzido com a estreita distribuição de tamanho. O tempo de hidrólise prolongado remove os domínios amorfos e também destrói parcialmente os domínios cristalinos.

Foi possível observar que houve formação de celulose do tipo II na condição NC60%1. Para as amostras em que foram utilizadas concentração de ácido sulfúrico de 9,6 mol.L⁻¹ (50% v/v) e temperatura de 45 °C o aumento no tempo de hidrólise resultou em uma diminuição na cristalinidade, indicando danos na estrutura cristalina de celulose.

As nanoceluloses apresentaram menores temperaturas de degradação, em relação à fibra e a celulose, devido a presença de grupos sulfato, confirmando a quebra da celulose de tamanhos micrométricos para tamanhos nanométricos.

A microscopia eletrônica de varredura demonstrou ser uma técnica inadequada para caracterizar as amostras quanto ao tamanho e a forma para as condições estudadas, pois, houve a formação de um filme sobre o substrato de silício o que impede a observação dos nanocristais de celulose. Foi observada a formação de *whiskers* nas amostras que utilizaram condições de extração de H₂SO₄ 50% a 45°C e que na amostra NC50%2 (H₂SO₄ 50% a 45°C por 2 horas) não foram observados grandes fragmentos.

Dentre as 6 condições de hidrólise ácida que foram realizadas, os nanocristais de celulose que apresentaram os melhores resultados quanto a coloração da suspensão obtida, índice de cristalinidade, propriedades térmicas, dimensão das partículas e potencial Zeta foram aqueles da amostra NC50%2 (H₂SO₄ 50%, 45°C por 2 horas).

7- Referências

Alemdar, A.; Sain, M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues - wheat straw and soy hulls. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1664-1671, 2008.

Alexandre, M.; Dubois, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. **Materials Science and Engineering**, v.28, p. 1-63, 2000.

Barth, O. M.; **Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas - Contrastação Negativa**, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, capítulo 6, p 1-14, 2007.

Beck-Candanedo, S.; Roman, M.; Gray, D. G. Effect of Reaction Conditions on the Properties and Behavior of Wood Cellulose Nanocrystal Suspensions. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1048-1054, 2005.

Benini, K. C. C. C. **Compósitos de nanocelulose/phbv: manta microfibrilica por eletrofiação**. 2015. 168f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2015.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA. **Atlas de energia elétrica do Brasil**. 3. ed. Brasília: ANEEL, 2008. 236 p.

Browning, L. **Methods of wood chemistry**. New York :Interscience Publishers, 1967. 439p.

Cardona, C.A.; Quintero, J.A.; Paz, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p.4754–4766, 2010.

Cerqueira, D. A.; G. Rodrigues Filho; Carvalho, R. A.; Valente, A. J. M.; Caracterização de Acetato de Celulose Obtido a partir do Bagaço de Cana-de-Açúcar por 1 H-RMN. **Polímeros**, v. 20, p. 85-91, 2010.

Cheng, Q.; Wang, S.; Rials, T. G. Poly(vinyl alcohol) nanocomposites reinforced with cellulose fibrils isolated by high intensity ultrasonication. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 40, p. 218-224, 2009.

Cherian, B. M.; Leão, L. A.; Souza, S. F.; Thomas, S.; Pothan, L. A.; Kottaisamy, M. Isolation of nanocellulose from pineapple leaf fibres by steam explosion. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 720-725, 2010.

Conab. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. v. 1, Brasília:Conab, 2013.

Cortez, L. A. B.; Lora E. E. S.; Gómez, E. O. **Biomassa para Energia**. **Campinas**: Editora da Unicamp, 2008, 733p.

Costa Neto, P. R., Rossi, L. F. S., Zagonel, G. F., Ramos, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel por meio da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, p. 531-537, 2000.

Curvelo, A. A. S. **Processos de deslignificação organossolve**. 1992. 94f. Tese (Livre Docência) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

Czaja, W.; Krystynowicz, A.; Bielecki, S; Brown, Jr. R. M. Microbial cellulose-the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, p. 145-151, 2006.

D'Almeida, M. L. O. **Celulose e papel**: tecnologia de fabricação de pasta celulósica. 2.ed. São Paulo: IPT, 1988. v.1, p. 45-105.

Dinand, E.; Chanzy, H.; Vignon, M. R. Parenchymal cell cellulose from sugar beet pulp: preparation and properties. **Cellulose**, v. 3, p. 183 – 188, 1996.

Dinand, E.; Vignon, M. R. Isolation and NMR characterisation of a (4-O-methyl-D-glucurono)-D-xylan from sugar beet pulp. **Carbohydrate Research**, 330, 285-288, 2001.

Dong, X. M. ; Kimura, T.; Revol, J. F.; Gray, D. G. Effects of Ionic Strength on the Isotropic-Chiral Nematic Phase Transition of Suspensions of Cellulose Crystallites. **Langmuir**, v. 12, p. 2076-2082, 1996.

Dufresne, A. **Nanocellulose: From Nature to High Performance Tailored Materials**. Germany: Editora De Gruyter, 2013, 455p.

Eichhorn, S. J. Cellulose nanowhiskers: promising materials for advanced applications. **Soft Matter**, v. 7, p. 303–315, 2011.

Elazzouzi-Hafraoui, S.; Nishiyama, Y.; Putaux, J. L.; Heux, L.; Dubreuil, F.; Rochas, C. The Shape and Size Distribution of Crystalline Nanoparticles

Prepared by Acid Hydrolysis of Native Cellulose. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 57-65, 2008.

Esteves, A. C. C; Timmons, A B; Trindade, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**, v. 27, p. 798-806, 2004.

Favier, V.; Canova, G. R.; Cavaille, J. Y.; Chanzy, H.; Dufresne, A.; Gauthier, C.; Nanocomposite materials from latex and cellulose whiskers. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 6, p. 351-355, 1995.

Favier, V.; Chanzy, H.; Cavaille, J. Y. Polymer Nanocomposites Reinforced by Cellulose Whiskers. **Macromolecules**, v. 28, p. 6365-6367, 1995.

Fenguel, D.; Wegener, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1984. 613p.

Flauzino Neto, W. P.; Silvério, H. A.; Dantas, N. O.; Pasquini, D. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue - Soy hulls. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 480-488, 2013.

Frone, A. N.; Panaitescu, D. M.; Donescu, D.; Spataru, C. I.; Radovici, C.; Trusca, R.; Somoghi, R. Preparation and characterization of PVA composites with cellulose nanofibers obtained by ultrasonication. **Bioresources**, v. 6, p. 487-512, 2011.

Gardner, K.H. and Blackwell, J. The hydrogen bonding in native cellulose. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 343, p.232–237, 1974.

Grunert, M.; Winter, W. T. Nanocomposites of Cellulose Acetate Butyrate Reinforced with Cellulose Nanocrystals. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 10, p. 27-30, 2002.

Habbi, Y.; Lucia, L. A.; Rojas, O. J. Cellulose nanocrystals: chemistry, selfassembly, and applications. **Chemical Reviews**, v. 110, p. 3479-3500, 2010.

Harris JR. **Negative Staining and Cryoelectron Microscopy: The Thin Film Techniques**. RMS Microscopy Handbook. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 1997.

Herrick, F.W. ; Casebier, R.L. ; Hamilton, J.K. ; Sandberg, K.R. Microfibrillated cellulose: morphology and accessibility. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 37, p. 815-827, 1983.

Heux, L.; Dinand, E.; Vignon, M. R. Structural aspects in ultrathin cellulose microfibrils followed by ^{13}C CP-MAS NMR. **Carbohydrate Polymers**, v. 40, 115-124, 1999.

ICIDCA: INSTITUTO CUBANO DE INVESTIGACIONES DE LOS DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZUCAR. **Manual de los derivados de la caña de azucar**. México:GEPLACEA, 1990. 447p.

Itoh, T.; Brown, Jr. R. M. Development of Cellulose Synthesizing Complexes in Boergesenia and Valonia. **Protoplasma**, v. 144, p. 160-169, 1988.

Kaushik, M.; Frascini, C.; Chauve, G.; Putaux, J.; Moores, A. **Transmission Electron Microscopy for the Characterization of Cellulose Nanocrystals** in: Chapter from the book *The Transmission Electron Microscope - Theory and Applications*. Publisher: InTech, 2015, 358f.

Klemm, D.; Kramer, F.; Moritz, S.; Lindström, T.; Ankerfors, M.; Gray, D.; Dorris, A. Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. **Angewandte Chemie**, v. 50, p. 5438-5466, 2011.

Klemm, D.; Heublein, B.; Fink, H. P.; Bohn, A. Cellulose: faszinierendes Biopolymer und nachhaltiger Rohstoff. **Angewandte Chemie**, v. 117, 3422-3458, 2005.

Klock, H.; Muñoz, G. I.; Hernandez, J. A.; Andrade, A. S. **Química da madeira**. 3 .ed. Paraná: UFPR, Setor de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal, 2005. Disponível em: <<http://www.madeira.ufpr.br/disciplinasklock/quimicadamadeira/quimicadamadeira.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2013.

Langford, J. I.; Wilson, A.J.C. Seherrer after Sixty Years: A Survey and Some New Results in the Determination of Crystallite Size. **Journal of Applied Crystallography**, v. 11, p. 102-113, 1978.

Lima, M. M. S.; Borsali, R. Rodlike cellulose microcrystals: structure, properties, and applications. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 25, p. 771-787, 2004.

Lu, P.; Hsieh, Y. Preparation and properties of cellulose nanocrystals: Rods, spheres, and network. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 329-336, 2010.

Mandal, A.; Chakrabarty, D. Isolation of nanocellulose from waste sugarcane bagasse (SCB) and its characterization. **Carbohydrate Polymers**, v, 86, p. 1291-1299, 2011.

Martín, C.; López, Y.; Plasencia, Y.; Hernández, E.; Characterization of agricultural and agro-industrial residues as raw materials for ethanol production. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 20, n. 4, p. 443-447, 2006.

Melo, S.Q.S.; França, A.F.S.; Lima, M.L.M.; Ribeiro, D.S.; Miyagi, E.S.; Reis, J.G. Parâmetros do valor nutritivo de nove variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 373-380, 2006.

MORAIS, S. A. L., NASCIMENTO, E. A., MELO, D. C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I – estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

Morán, J.I.; Alvarez, V.A.; Cyras, V.P.; Vázquez, A. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. **Cellulose**, v. 15, p. 149–159, 2008.

Nam, P. H.; Maiti, P.; Okamoto, M.; Usuki, T.; Hasegawa, N.; Usuki, A. A hierarchical structure and properties of intercalated polypropylene/clay nanocomposites. **Polymer**, v. 42, p. 9633-9640, 2001.

Nimz, H. Beech lignin – proposal of a constitutional scheme. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 13, p. 313-321, 1974.

Oberdisse, J. Aggregation of colloidal nanoparticles in polymer matrices. **Soft Matter**, v.2, p. 29-36, 2005.

Oh, S. Y.; Yoo, D. I.; Shinb, Y.; Seoc, G. FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 417–428, 2005.

Orlando, U.S.; Baes, A.U.; Nishijima, W.; Okada, M. A new procedure to produce lignocellulosic anion exchangers from agricultural waste materials. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 195-198, 2002.

Orts, W. J.; Godbout, L.; Marchessault, R. H.; Revol, J.F. Enhanced Ordering of Liquid Crystalline Suspensions of Cellulose Microfibrils: A Small Angle Neutron Scattering Study. **Macromolecules**, v. 31, p. 5717-5725, 1998.

O'Sullivan, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, p. 173-207, 1997.

Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Soccol, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane Bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, p. 69-80, 2000.

PASQUINI, D. **Polpação organossolve/dióxido de carbono supercrítico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2004. 180 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

Paturau, J.M. **By-products of the cane sugar industry**; New York: Elsevier; 1969. 274 p.

Peng, B. L.; Dhar, N., Liu, H. L.; Tam, K. C. Chemistry and applications of nanocrystalline cellulose and its derivatives: A nanotechnology perspective. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 9999, p. 1-16, 2011.

Pereira, A. L. S.; Cordeiro, E. M. S.; Nascimento, D. M.; Morais, J. P. S.; Sousa, M. S.M.; Rosa, M. F. **Extração e caracterização de nanocelulose de fibras do pseudocaule da bananeira**. In: V Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação, 2010, Maceió. 2010.

Petersson, L.; Kvien, I; Oksman, K. Structure and thermal properties of poly(lactic acid)/cellulose whiskers nanocomposite materials. **Composites Science and Technology**, v. 67, p. 2535-2544, 2007.

Piló-Veloso, D.; Nascimento, E. A.; Morais, S. A. L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, v. 16, n. 5, p. 435-448, 1993.

Revol, J. F. On the cross-sectional shape of cellulose crystallites in valonia ventricosa. **Carbohydrate Polymers** 2, v. 2, p. 123-134, 1982.

Roman, M.; Winter, W. T. Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1671-1677, 2004.

Rosa, M.F.; Medeiros, E.S.; Malmonge, J.A.; Gregorski, K.S.; Wood, D.F.; Mattoso, L.H.C.; Glenn, G.; Orts, W.J.; Imam, S.H. Cellulose nanowhiskers from coconut husk fibers: effect of preparation conditions on their thermal and morphological behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 83-92, 2010.

Roy, R.; Komarneni, S.; Roy, D. M. Multi-Phasic Ceramic Composites made by Sol-Gel Technique. **Materials Research Society Symposium Proc.**, 1984, v. 32, p. 347-359, 1984.

Rowell, R. M. **Handbook of wood chemistry and wood composites**; New York: Taylor e Francis; 2005. 473 p.

Sain, M.; Panthapulakkal, S. Bioprocess preparation of wheat straw fibers and their characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 23, p. 1-8, 2006.

Sani, A.; Dahman, Y. Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 151-164, 2010.

Sarrouh, B. F.; Silva, S. S.; Santos, D. T.; Converti, A.; Technical/Economical Evaluation of Sugarcane Bagasse Hydrolysis for Bioethanol Production. **Chemical Engineering e Technology**, v. 30, p. 270-275, 2007.

Santos, R. M. **Extração e caracterização de nanocristais de celulose a partir de folhas de abacaxi**. 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

Segal, L.; Creely, J.J.; Martin Jr, A.E.; Conrad, C.M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v.29, p.786–794, 1959.

Schaefer, D. W.; Justice, R. S.; How Nano Are Nanocomposites?. **Macromolecules**, v. 40, p. 8501-8517, 2007.

Schmaljohann, D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1655-1670, 2006.

Sene, L.; Converti, A.; Felipe, M. G. A.; Zilli, M. Sugarcane bagasse as alternative packing material for biofiltration of benzene polluted gaseous streams: a preliminary study. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 153–157, 2002.

Sjöström, E. **Wood chemistry: fundamentals and applications**. New York: Academic Press, 1981. 223p.

Silva, D. J.; D'Almeida, M. L. O. Cellulose Whiskers. **O Papel**, v. 70, p. 34-52, 2009.

Silva, D. M. ; Musial, D. C.; Altmeyer, C.; Valentini, S. A. Obtenção de derivado de celulose a partir do bagaço de cana-de-açúcar com potencial aplicação nas indústrias farmacêutica e cosmética. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, p. 41-45, 2011.

Scherrer, P. Estimation of the size and internal structure of colloidal particles by means of röntgen, *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen*, v. 26, p. 98, 1918.

Siqueira, G., Abdillahi, H., Bras, J., Dufresne, A. High reinforcing capability cellulose nanocrystals extracted from *Syngonanghus nitens* (Capim Dourado). **Cellulose**, vol. 17, p. 289-298, 2010.

Souza, N. F. **Processos de obtenção de nanocelulose a partir das fibras da prensagem do mesocarpo do dendê**. 2014. 204f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

Sun, J.X.; Sun, X.F.; Zhao, H.; Sun, R.C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagass. **Polymer Degradation and Stability**, v. 84, p. 331-339, 2004.

Sun, X. F.; Xu, F.; Sun, R. C.; Fowler, P.; Baird, M. S. Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 97-106, 2005.

Tan, S. Y.; MacFarlane, D. R.; Upfal, J.; Edye, L. A.; Doherty, W. O. S.; Patti, A. F.; Pringle, J. M.; Scott, J. L. Extraction of lignin from lignocellulose at atmospheric pressure using alkylbenzenesulfonate ionic liquid. **Green Chemistry**, v. 11, p.339-345, 2009.

TAPPI: Technical Association of the Pulp and Paper Industry. **Solvent extractives of wood and pulp**, T204 cm-97, 1997.

TAPPI: Technical Association of the Pulp and Paper Industry. **Acid-insoluble lignin in wood and pulp**, T222 om-02, 2006.

Teixeira, D.M. Bondancia, T. J.; Teodoro, K. B. R.; Corrêa, A. C.; Marconcini, J. M.; L. H. C. Sugarcane bagasse whiskers: Extraction and characterizations. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 63-66, 2011.

Tokoh, C.; Takabe, K.; Fujita, M.; Saiki, H. Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of acetyl glucomannan. **Cellulose**, v. 5, p. 249-261, 1998.

Triana, O.; Leonard, M.; Saavedra, F.; Fernández, N.; Gálvez, G.; Peña, E. **Atlas del bagazo de la caña de azúcar of sugarcane bagasse**. GEOPLACEA, 1990, 143 p.

Vieira, J. G.; Oliveira, G. C.; Rodrigues Filho, G.; Assunção, R. M. N.; Meireles, C. S.; Cerqueira, D. A.; Silva, W. G.; Motta, L. A. C. Production, characterization and evaluation of methylcellulose from sugarcane bagasse for applications as viscosity enhancing admixture for cement based material. **Carbohydrate Polymers**, v.78, p. 779–783, 2009.

Wang, K. H.; Choi, M. H.; Koo, M. C.; Choi, Y. S.; Chung, I. J.; Synthesis and characterization of maleated polyethylene/clay nanocomposites. **Polymer**, v. 42, p. 9819-9826, 2001.

Winey, K. I.; Vaia, R. A.; Polymer Nanocomposites. **MRS Bulletin**, v. 32, p. 314-322, 2007.

Wada, M.; Okano, T. Localization of I₁ and I₂ phases in algal cellulose revealed by acid treatments. **Cellulose**, v.8, p. 183-188, 2001.

Zandersons, J.; Gravitis, J.; Kokorevicsa, A.; Zhrinsha, A.; Bikovenska, O.; Tardenakaa, A.; Spincea, B. Studies of the Brazilian sugarcane bagasse carbonisation process and products properties. **Biomass and Bioenergy**, v.17, p. 209-219, 1999.

Zhou, Y. M.; Fu, S. Y.; Zheng, L. M.; Zhan, H. Y. Effect of nanocellulose isolation techniques on the formation of reinforced poly(vinyl alcohol) nanocomposite films. **Polymer Letters**, v.6, p. 794-804, 2012.

Zykwinska, A. W.; Ralet, M. C. J.; Garnier, C. D.; Thibault, J. F. J. Evidence for *in vitro* binding of pectin side chains to cellulose. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 139, p. 397-407, 2005.

Parte B: Síntese Hidrotérmica de Nanopartículas de Hidroxiapatita Coloidal

1. Introdução

A aplicação de biomateriais no reparo do tecido ósseo revolucionou os tratamentos ortopédicos e odontológicos. Para ser um material alternativo viável para o osso, deve ser biocompatível, possuir uma resistência biofuncional e possuir as propriedades mecânicas e químicas necessárias para suportar esforços impostos (ALMEIDA *et al.*, 2007; FENG *et al.*, 2000; STORZ *et al.*, 2001). A busca de materiais com propriedades de biocompatibilidade constitui um grande desafio para pesquisadores no campo dos novos materiais. Neste sentido, o biomimetismo e a bioinspiração são utilizados para a síntese e desenvolvimento de materiais e dispositivos inovadores para várias aplicações biomédicas. A biomimética para síntese de biomateriais pode ser realizada em diferentes níveis de acordo com a composição, estrutura, morfologia e propriedades físico-químicas do material sintético (ROVERI, IAFISCO, 2010; WANG *et al.*, 2007).

A hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ foi estudada e aplicada em vários campos de pesquisa biomédica, devido à sua semelhança com os constituintes minerais dos ossos e dentes humanos. Ela representa 30 a 70% da massa dos ossos e dentes (SHIN, JO, MIKOS, 2003). As nanopartículas de hidroxiapatita sintética (HA) apresentam boa biocompatibilidade, bioatividade e osteoinducibilidade (ALMEIDA *et al.*, 2007; CANGEMI *et al.*, 2008; FENG *et al.*,

2000; SHIN, JO, MIKOS, 2003; STORZ *et al.*, 2001; VALIMAA, LAAKSOVIRTA, 2004).

Com a nanotecnologia, é possível sintetizar cristais inorgânicos com dimensões nanométricas, caracterizados por uma elevada área superficial, controle de forma e organização estrutural que aumentam a bioreatividade cristalina. Para a otimização das aplicações do HA biomimético, características como tamanho, porosidade, morfologia e propriedades da superfície, devem ser adaptadas de acordo com a aplicação (ROVERI, IAFISCO, 2010). Embora existam diversas rotas de síntese para produzir cristais de hidroxiapatita nanométrica (CHEN *et al.*, 2007; DHAND, RHEE, PARK, 2014; GAO *et al.*, 2013; JIN *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2005), pouca atenção tem sido dada aos detalhes físicos e químicos envolvidos no controle da forma e da distribuição de tamanho das nanopartículas. No caso da distribuição de tamanho de partícula, a maioria das rotas sintéticas produzem uma mistura de partículas com uma grande distribuição de tamanho de dezenas a centenas de nanômetros e muitas não mostram controle de formas (LEENA *et al.*, 2016; ROVERI, PALAZZO, IAFISCO, 2008).

Nesta etapa, foram avaliadas a influência das diferentes condições experimentais na síntese hidrotérmica de nanopartículas de hidroxiapatita, utilizando o planejamento fatorial para a otimização dos resultados. Isso possibilita a criação de um modelo para o controle do tamanho e da forma das nanopartículas. Embora os estudos que utilizem o projeto fatorial para entender o efeito de algumas condições experimentais sobre as propriedades finais das nanopartículas de hidroxiapatita coloidal tenham sido publicados anteriormente, (ARANTES *et al.*, 2012; BAKAN, LAÇIN, SARAC, 2013; GAO *et al.*, 2013; JIN *et al.*, 2015; NOSENKO *et al.*, 2015; OKADA, FURUZONO, 2011; MASSART *et al.*, 1988) apenas alguns avaliaram a significância estatística dos efeitos. Normalmente, esses estudos apresentam modelos que consideram os parâmetros experimentais que afetam o tamanho das partículas, que foram previamente identificadas em estudos univariados, mas sua significância estatística foi ignorada. Portanto, este estudo pretende apresentar uma maneira efetiva de prever o tamanho de partícula final das nanopartículas coloidais de hidroxiapatita.

2- Revisão Bibliográfica

2.1- Materiais Cerâmicos

Os materiais podem ser classificados quanto a sua estrutura ou propriedades: metais, cerâmicas e vidros, polímeros, compósitos e semicondutores (ASKELAND, PHULÉ, 2013; SHACKELFORD, 2008). Cerâmicas apresentam excelente resistência à compressão, alta dureza, mas pode ser quebradiços (mecanicamente frágeis) (ASKELAND, PHULÉ, 2013; ZARBIN, 2007). Cerâmicas são consideradas um dos principais materiais naturais como a areia das praias, as rochas e a hidroxiapatita a cerâmica do próprio corpo (ASKELAND, PHULÉ, 2013). As cerâmicas são empregadas na construção de chips, sensores, capacitores, refratários, capacitores para microeletrônica, fibras óticas, etc. As cerâmicas também são utilizadas em materiais compósitos de consumo como tintas, em embalagens, plásticos e pneus (ASKELAND, PHULÉ, 2013; SHACKELFORD, 2008; ZARBIN, 2007).

Alumina (Al_2O_3), óxido de magnésio (MgO), nitreto de silício (Si_3N_4) e sílica (SiO_2) são exemplos das cerâmicas tradicionais. A grande maioria das cerâmicas comerciais são formadas por pelo menos um elemento metálico e um dos cinco elementos não-metálicos (C, N, O, P ou S) que podem ser combinados para formar um enorme número de materiais cerâmicos, mas que materiais cerâmicos mais complexos podem ser formados combinando muito mais que dois elementos (SHACKELFORD, 2008).

2.1.1- Biocerâmicas

Os materiais utilizados na substituição de tecidos enquadram-se em uma classe denominada de biomateriais e devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos, ou seja, serem biocompatíveis (KAWACHI, 2000; PEREIRA, VASCONCELOS, ORÉFICE, 1999). Os materiais sintéticos utilizados para esses fins podem ser metais, polímeros, compósitos, cerâmicas e vidros (PEREIRA, VASCONCELOS, ORÉFICE, 1999). As

cerâmicas utilizadas para o reparo e reconstrução de partes do sistema músculo-esqueléticas são denominadas biocerâmicas (HENCH, 1991). Podem ser bioinertes (alumina, zircônia), reabsorvíveis (fosfato de tricálcio), bioativas (hidroxiapatita, vidros bioativos e cerâmicas de vidro) ou porosas para o crescimento do tecido (metais revestidos de hidroxiapatita, alumina).

Dentro das aplicações clínicas as vantagens que o uso de biocerâmicas apresentam são boa biocompatibilidade, resistência a corrosão e alta resistência à compressão. Como desvantagem apresentam baixa força de tensão, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade e alta densidade (Kawachi, 2000). Uma alternativa para minimizar suas desvantagens é o uso de biocerâmicas para revestir metais ou no uso como agentes de reforço em polímeros para formar compósitos com melhoradas propriedades mecânicas.

Dentre as biocerâmicas os fosfatos de cálcio destacam-se, pois apresentam biocompatibilidade, osteocondutibilidade, osteoindutibilidade intrínseca, e dentre eles a hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. As aplicações dos fosfatos de cálcio incluem implantes dentários, dispositivos percutâneos e uso no tratamento periodontal, tratamento de defeitos ósseos, tratamento de fraturas, reposição total da articulação (aumento ósseo), ortopédica, reconstrução cranio-maxilofacial, otorrinolaringologia e cirurgia espinhal (Dorozhkin, 2010). Dependendo de se desejar um material bioreabsorvível ou bioativo, podem ser usados diferentes ortofosfatos de cálcio (Dorozhkin, 2010). As pesquisas recentes focam-se na superação das limitações de fosfatos de cálcio e cerâmicas de hidroxiapatita, como baixa bioresorbabilidade, baixa área superficial e biorreatividade baixa e a melhoria de suas propriedades biológicas (ROVERI, IAFISCO, 2010; WANG *et al.*, 2007).

2.1.1.1. Hidroxiapatita (HA)

A hidroxiapatita, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, é o principal componente mineral das estruturas ósseas e dentárias, correspondendo a cerca de 30-70% da massa de ossos e dentes (ALMEIDA *et al.*, 2007). Nos ossos a HA apresenta-se como cristais homogêneos semelhantes a placas, com diâmetros de 15-50 nm, no esmalte e dentina são cristais de HA em forma de grânulos com diâmetros de

25-100 nm e comprimentos de 100 nm (CAI, TANG, 2008; ROVERI, IAFISCO, 2010; TAMPIERI, CELOTTI, LANDI, 2005).

A hidroxiapatita sintética tem sido estudada e utilizada, pois apresenta biocompatibilidade com minerais ósseos e não possui fases distintas de outros fosfatos de cálcio quando cuidadosamente sintetizado (CANGEMI *et al.*, 2008; VALIMA, LAAKSOVIRTA, 2004). O estudo da biomineralização e montagem biomimética envolve a busca de um método avançado para que a síntese de nanocristais de HA possa ser controlada com precisão (CAI, TANG, 2008; ROVERI, IAFISCO, 2010; TAMPIERI, CELOTTI, LANDI, 2005). Devido aos seus efeitos únicos de confinamento quântico e à reatividade da área superficial, a HA nanocristalina exhibe melhor bioatividade, biocompatibilidade e propriedades mecânicas melhoradas do que as microcristalinas e a granel (VARADARAJAN *et al.*, 2014). No entanto, os implantes feitos com hidroxiapatita pura exibem baixa resistência à tração, impacto e resistência à fadiga (CHOI, MARRA, KUMTA, 2004; GUASTALDI, 2003).

A hidroxiapatita quando utilizada como reforço em materiais poliméricos, com formato de whiskers e fibras, mostram biocompatibilidade, inércia química, resistência à corrosão e alta resistência a compressão (CHOI, MARRA; KUMTA, 2004). As aplicações das nanopartículas de HA são influenciadas pela forma e cristalinidade e pureza do material sintetizado. Portanto, é importante controlar a forma, tamanho e estrutura cristalina das nanopartículas de acordo com as diferentes condições de síntese. As propriedades da hidroxiapatita mudam dependendo do processo de síntese. Quando sintetizada em alta temperatura apresenta boa cristalinidade e cristais grandes, quando sintetizada em baixas temperaturas apresenta baixa cristalinidade e cristais pequenos. Uma diminuição do pH abaixo de 9 da solução preparada para realização do método hidrotérmico também pode conduzir a formação de hidroxiapatita deficiente de Ca (CHOI, MARRA; KUMTA, 2004; FENG, 2000).

2.2. Nanomateriais

Nanopartículas eram estudadas muito antes que a palavra nanotecnologia. Por exemplo, o uso de nanopartículas de ouro e prata para dar

características especiais a vidros produzidos na Roma antiga a nanopartículas de prata usadas para curar feridas desde a antiguidade (POOLE, OWENS, 2003).

O termo "Nanotecnologia" foi criado em 1974 por Taniguchi e foi usada para descrever a habilidade de se criar materiais precisa na escala manométrica (Sandhu, 2006). Posteriormente, diversos pesquisadores apresentam definições para o termo. Para Askeland e Phulé (2013) o termo nanotecnologia é usado para descrever um conjunto de tecnologias baseadas em fenômenos físicos, químicos e biológicos que ocorrem em escala nano. Segundo Zarbin (2007) e deve-se resaltar que só existe um nanomaterial se existir uma propriedade que se manifesta exclusivamente devido ao tamanho reduzido, e esta propriedade é diferente do material macroscópico. Portanto a nanociência e a nanotecnologia, estudam a síntese, controle de tamanho e forma e caracterização de nanomateriais, nanopartículas e nanocompósitos, além de estudar a compreensão de efeitos de confinamento quânticos associados ao tamanho (POOLE, OWENS, 2003; ZARBIN, 2007).

2.2.1. Síntese de Nanopartículas

Nanopartículas podem ser sintetizadas por dois grandes métodos: os físicos ou os químicos. Os métodos físicos, também conhecidos como *top down*, são aqueles em que se manipula o material em escala macro, quebra-se as partículas até que fiquem em escala nanométrica. Sonólise e nanolitografia são exemplos deste método de preparação (HATZOR, WEISS, 2001). Os métodos químicos, conhecidos como *bottom up*, possibilitam maior controle sobre o processo, baseados em reações químicas que utilizam precursores moleculares ou atômicos para a obtenção das nanopartículas desejadas (ZANCHET, MORENO, UGARTE, 1999). Demonstram a possibilidade de se gerar, de forma controlada, partículas na forma cilíndrica, cúbicas, triangulares, prismáticas, bastões, placas, entre outras (RONGCHAO *et al.*, 2003).

Existem vários métodos de síntese para a obtenção de nanopartículas coloidais, como: o método hidrotérmico, o de co-precipitação e o de precursores poliméricos ou sol-gel (CHEN *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2013; JIN *et*

al., 2015; MURAKAMI *et al.*, 2012; SADAT-SHOJAI, ATAI, NODEHI, 2011; ZHAO *et al.*, 2014) (OKADA, FURUZONO, 2011; DHAND, RHEE, PARK, 2014), (BAKAN, LAÇIN, SARAC, 2013). Dentro do estudo de nanopartículas é importante a obtenção de amostras com estreita distribuição de tamanho.

Durante a síntese, nanopartículas tendem a se aglomerar e crescer devido a sua elevada área superficial e, portanto, alta energia superficial (PENG, WICKHAM, ALIVISATOS, 1998). Para minimizar o crescimento descontrolado ou a aglomeração das nanopartículas, normalmente se utilizam dois mecanismos de estabilização: estabilização de partículas por carga, onde a estabilização ocorre devido à repulsão das cargas superficiais existentes nas nanopartículas, por apresentarem a superfície eletricamente carregada (GAO *et al.*, 2004); e estabilização por efeito estérico, onde a estabilização se deve ao impedimento estérico originado por moléculas orgânicas ligadas à superfície das nanopartículas, estas moléculas são conhecidas como agente protetor ou passivante) (ZANCHET *et al.*, 1999).

2.2.1.1. Síntese de Nanopartículas de Hidroxiapatita

O método hidrotérmico despertou grande interesse devido à sua boa repetibilidade, ampla gama de temperaturas, a possibilidade de controlar a forma, tamanho e simplicidade da operação e a capacidade de produzir nanopartículas cristalinas sem tratamento térmico posterior (JIN *et al.*, 2015). A vantagem do processamento hidrotérmico é a capacidade de controlar a composição, forma e tamanho, e especialmente para obter suspensões coloidais estáveis de nanopartículas. Outra vantagem é que não requer o passo final de calcinação para obter um material cristalino puro (WANG *et al.*, 2010; WIJESINGHE *et al.*, 2014). O método hidrotérmico utiliza a pressão e a temperatura em meio aquoso para a síntese e cristalização das nanopartículas.

O uso de princípios estatísticos para os planejamentos experimentais permite extrair do sistema o máximo de informação útil, realizando-se um número mínimo de experimentos (BARROS NETO, SACARMINIO, BRUNS, 2001). Pensando nisso os princípios da estatística podem ser uma excelente ferramenta para prever as condições de síntese das nanopartículas com o

tamanho e a forma desejada. A maioria dos estudos com o objetivo de obter nanopartículas de HA com formas e tamanhos variados usa uma abordagem univariada. Nesta abordagem todas as variáveis são mantidas a um nível constante e apenas uma delas é alterada para maximizar a propriedade estudada (ARANTES *et al.*, 2012). Este processo é repetido para avaliar o valor ideal para cada variável do sistema. O método univariado não considera interações entre variáveis. Assim, o melhor valor de uma variável pode levar a uma interpretação incorreta dos resultados. Para resolver este problema, a abordagem multivariada deve ser usada. Na abordagem multivariada, todas as variáveis são alteradas ao mesmo tempo (JILLAVENKATESA, CONDRATE, 1997; MASSART *et al.*, 1988). A abordagem multivariada é uma poderosa ferramenta para medir e entender os efeitos de variáveis independentes específicas, pois é possível estimar as interações entre as variáveis na resposta experimental, com um pequeno número de experiências. Além disso, permite a previsão de propriedades do sistema em experimentos não realizados.

3- Objetivos

O objetivo foi sintetizar dispersões coloidais estáveis homogêneas de nanopartículas de hidroxiapatita com controle de tamanho e forma a ser usado como agentes de reforço em polímeros biocompatíveis para serem utilizados como biomateriais em aplicações médicas.

4- Materiais e Métodos

4.1- Síntese de nanopartículas de hidroxiapatita

As nanopartículas de hidroxiapatita foram sintetizadas por síntese hidrotérmica. Em um frasco de autoclave de 100 mL, adicionou-se gota a gota uma solução aquosa de fosfato de amônio (Aldrich, 98%) a uma solução de cloreto de cálcio (Aldrich, 93%). A razão molar (Ca/P) manteve-se constante de

acordo com a sua razão estequiométrica na hidroxiapatita (1,67). As concentrações dos precursores são objetos do planejamento fatorial (0,03 e 0,1 mol.L⁻¹). O pH da mistura foi ajustado para 9 pela adição de solução aquosa de amônia (Aldrich, 28-30%) posteriormente o frasco foi levado a estufa em tempos diferentes (24 e 48 horas). Após o tempo de síntese, o sistema de reação foi deixado arrefecer até à temperatura ambiente; posteriormente, as amostras foram secas em uma placa de Petri a 50°C.

Para a otimização da síntese foi realizado um planejamento fatorial em dois níveis e três fatores, 2³, exigindo 8 experimentos para avaliar os parâmetros que influenciam o tamanho das nanopartículas de hidroxiapatita. As três variáveis testadas foram a temperatura de síntese (T), as concentrações de precursores (C) e o tempo de reação (t), em condições experimentais baseadas na literatura (BHATTACHARJE *et al.*, 2016; JIN *et al.*, 2015; NOSENKO *et al.*, 2015; SADAT-SHOJAI, ATAI, NODEHI, 2011; WIJESINGHE *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2014). Todos os cálculos da matriz foram realizados usando o software livre GUI Octave versão 3.6.

Dois níveis, alto (+) e baixo (-), foram definidos para cada fator, como mostrado na Tabela 9. A relação estequiométrica dos precursores foi mantida constante em 1:1, assim, as concentrações de precursores utilizadas foram 0,03 e 0,1 mol.L⁻¹. Essas experiências foram conduzidas em uma ordem aleatória.

Tabela 9. Matriz do planejamento fatorial 2^3 para a síntese das nanopartículas de hidroxiapatita.

Variáveis	Nível baixo (-)	Nível alto (+)						
Temperatura (°C)	100	140						
Tempo (h)	24	48						
Concentração (mol L ⁻¹)	0,03	0,1						
Resposta	Tamanho da nanopartícula (nm)							
	Experimento							
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Temperatura	-	+	-	+	-	+	-	+
Tempo	-	-	+	+	-	-	+	+
Concentração	-	-	-	-	+	+	+	+

Posteriormente, calculou-se o tamanho médio das nanopartículas obtidas para cada condição experimental, os principais efeitos e os efeitos secundários e terciários (efeitos de interação); Efeitos significativos foram considerados na formulação do modelo para descrever como os fatores e as interações podem influenciar o tamanho médio das partículas. Os tamanhos médios de nanopartículas foram obtidos usando o software livre Image J, contando cerca de 200 partículas em várias imagens (cerca de 10 imagens por amostra) obtidas em diferentes regiões da amostra. Além disso, para cada amostra, as sínteses foram realizadas em duplicatas cujos produtos foram caracterizados por MEV e MET e os tamanhos utilizados na construção de histogramas.

4.2- Caracterizações das nanopartículas de Hidroxiapatita

4.2.1- Difração de Raios X

Para caracterização de sua estrutura cristalina as nanopartículas foram caracterizadas por difração de raios X (XRD), utilizando um difractor Rigaku modelo DMax 2500PC (radiação Cu K α) com $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$, operando

na faixa de 2θ de 10° a 110° com uma velocidade de passo de $0,02^\circ$ e um tempo de passo de 1s.

4.2.2- Espectroscopia de Raman

Os espectros Raman foram obtidos usando um espectrômetro Bruker RFS100 com laser ND-YAG (1064 nm), usando uma potência de 150 mW e região de $100\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$, com 32 varreduras e uma resolução de 4 cm^{-1} em temperatura ambiente.

4.2.3- Espectroscopia no Infravermelho (IV)

A avaliação qualitativa da composição química foi obtida utilizando a espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utilizando um acessório de Reflectância Difusa (DRIFT) (Bruker Equinox 55). Os espectros foram registrados na faixa de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ com uma resolução de 2 cm^{-1} .

4.2.4- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das partículas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. Para esse efeito, foi utilizado um microscópio Zeiss Supra 35VP com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (FEG-SEM) trabalhando a 30 kV. Para tanto as nanopartículas de sílica foram dispersas em acetona (1% m/m) em um banho ultrasônico por 15 min e posteriormente uma alíquota de cada suspensão foi depositada sobre um substrato de silício.

4.2.5- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As imagens de MET foram obtidas com um JEOL JEM-3010 operando a 300 kV equipado com um modelo de câmera CCD multi-Scan GATAN (Warrendale, PA, EUA) 794. As imagens de MEV foram gravadas com um JEOL JSM-5600LV operado a 20 kV, usando elétrons secundários para formar

a imagem. As nanopartículas foram dispersas em água com um banho de ultrassom por 30 minutos. Uma gota desta dispersão foi depositada sobre uma grade de cobre de 200 mesh recoberta com um filme fino do polímero Formvar®.

5- Resultados e Discussão

5.1- Obtenção e caracterização de nanopartículas de hidroxiapatita

A composição das nanopartículas obtidas no processo de otimização da síntese pelo planejamento fatorial 2^3 foi caracterizada por difração de raios X, espectroscopia Raman e espectroscopia no infravermelho. A morfologia das nanopartículas de hidroxiapatita foi analisada por microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. O cálculo do tamanho médio das nanopartículas obtidas para cada condição experimental foi realizado usando o software livre Image J com imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão.

5.1.1- Difração de Raios X (DRX) das nanopartículas de hidroxiapatita

As aplicações de nanopartículas de HA são influenciadas pela morfologia e cristalinidade (WANG *et al.*, 2010). Nesse contexto, foi importante estabelecer uma relação clara entre as condições experimentais e a morfologia das partículas e a cristalinidade.

As estruturas cristalinas das amostras sintetizadas com diferentes condições experimentais são mostradas na Figura 25. Todos os picos de difração do padrão DRX foram indexados na fase hexagonal da hidroxiapatita (JCPDS PDF No. 090432) (WIJESINGHE *et al.*, 2014). Os resultados correspondem a uma fase HA cristalina com célula unitária hexagonal e parâmetros de rede $a = 9,432 \text{ \AA}$ e $c = 6,881 \text{ \AA}$. Além disso, não foram observados em nenhuma condição experimental picos adicionais, especialmente na faixa de $27\text{-}31^\circ$, estes picos seriam atribuídos à fase de

fosfato de tetracálcio (TTCP) ou fase de fosfato tricálcico (β -TCP) que geralmente está presente em nanopartículas de HA (NOSENKO *et al.*, 2015).

Os tamanhos de cristalitos de cada amostra puderam ser calculados a partir dos difratogramas. Com este intuito utilizou-se a equação de Scherrer para realizar os cálculos:

$$L = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (3)$$

onde: (L) é o tamanho do cristalito; (K) é a constante de proporcionalidade (a constant de Scherrer, K= 0.9); (λ) é o comprimento de onda da radiação do raios X CuK α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$); (β) é a largura a meia-altura do pico de difração (FWHM, Peak width in Full Width at Half Maximum); (θ) é o ângulo de difração (SCHERRER, 1918; LANGFORD, WILSON, 1978).

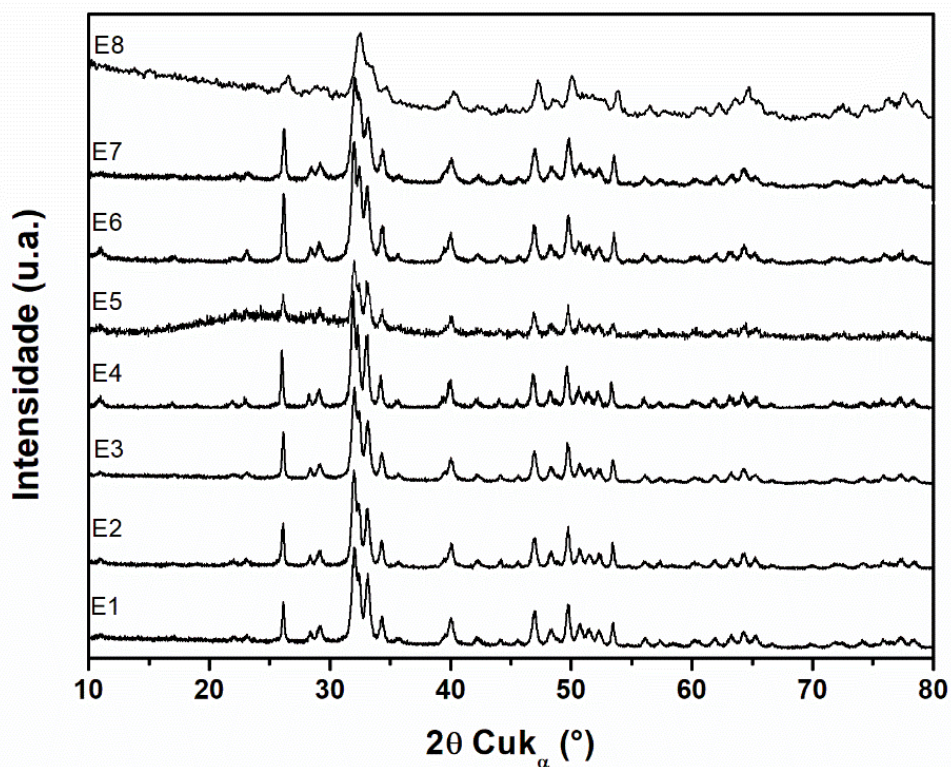


Figura 25. Difratogramas de raios X das nanopartículas de HA sintetizadas em diferentes condições experimentais. As condições experimentais são apresentadas na tabela 9.

A Tabela 10 mostra os tamanhos de cristalitos (L) para diferentes picos de difração. O tamanho de cristalito para cada uma das amostras, exceto a amostra E5, mostrou estreita distribuição de tamanho com L variando de 12 a 23 nm para a maioria dos picos de difração, apenas no pico relativo ao plano (002) foram observados valores maiores de L na faixa de 28-48 nm. Este resultado indica que existe um crescimento preferencial das nanopartículas perpendiculares a este plano. A amostra E5 mostrou L em torno de 8 nm para todos os picos de difração indicando que, para esta condição de síntese, os cristalitos não apresentam crescimento preferencial em qualquer direção. Dhand e colaboradores (2014) estudaram a síntese de nanocristais de HA por síntese em via úmida (co-precipitação). Observaram esse mesmo crescimento preferencial na direção (002) no eixo c, com tamanhos de cristalitos entre 15-60 ± 5 nm e comprimentos de aproximadamente 500 nm, confirmados por microscopia eletrônica de transmissão. Sadat-Shojai e colaboradores (2011), em seus estudos sobre a síntese hidrotérmica de hidroxiapatita, também observaram esse mesmo comportamento de crescimento preferencial das nanopartículas, e relataram que o tamanho do eixo c aumenta quando a temperatura do tratamento hidrotérmico aumenta.

Tabela 10. Tamanhos de cristalitos (L) para diferentes picos de difração das nanopartículas de hidroxiapatita. As condições experimentais são apresentadas na tabela 9.

Planos	L (nm)							
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
(002)	48	34	37	41	9	27	34	28
(211)	17	19	17	23	8	19	17	14
(112)	17	18	20	22	9	16	21	15
(300)	16	16	17	17	8	16	16	13
(202)	19	20	23	23	9	20	20	12

5.1.2- Espectroscopia Ramam das nanopartículas de hidroxiapatita

Os resultados da espectroscopia Raman para nanopartículas de hidroxiapatita são mostrados na Figura 26.

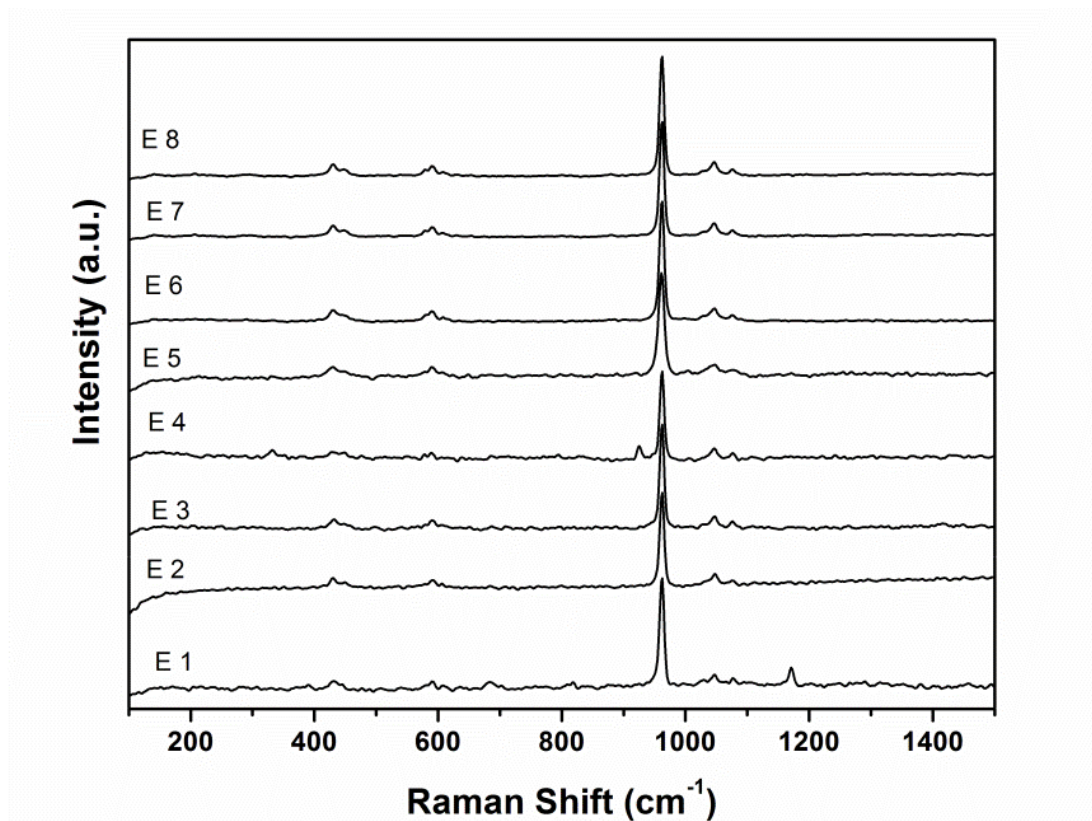


Figura 26. Espectroscopia Raman para as nanopartículas de HA. As condições experimentais são apresentadas na tabela 9.

Pode se observar na Figura 26 que os espectros Raman de todas as amostras são semelhantes e apresentam vibrações típicas da HA, com as bandas principais observadas na faixa espectral 360-1160 cm⁻¹. As bandas de 431 e 450 cm⁻¹ foram atribuídas às vibrações de fosfato ν_2 , bandas a 585 e 610 cm⁻¹ de fosfato (ν_4) e em 960 cm⁻¹ é devido vibrações ν_1 de PO₄³⁻ (JIN *et al.*, 2015; NOSENKO *et al.*, 2015). Os modos Raman observados na faixa de 1020-1080 cm⁻¹ podem ser atribuídos ao modo ν_1 de estiramento da ligação C-O do grupo carbonato (CHEN *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2013; JIN *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2014), e ao modo de flexão do carbonato em 1045 cm⁻¹ (JIN *et al.*, 2015), que se sobrepõe, devido a sua base larga, às vibrações do fosfato ν_3 (GAO *et al.*, 2013). De acordo com Nosenko e colaboradores (2015), os valores das frequências de PO₄³⁻ na água obtidos a partir das medidas de espalhamento

Raman são ν_1 em 936 cm^{-1} , ν_2 em 415 cm^{-1} , ν_3 em 1010 cm^{-1} e ν_4 em 558 cm^{-1} (RUDOLPH, IRMER, 2014).

Geralmente, a banda em 945 cm^{-1} é atribuída ao fosfato de cálcio amorfo, como pode ser visto na amostra E4 (SAUER et al., 1994), o que indica uma estrutura desordenada, embora não necessariamente amorfa, e vibração ν_1 do grupo PO_4^{3-} de fosfato tricálcico (β -TCP) (JILLAVERNKATESA, CONDRATE, 1997). No entanto, a presença de fase β -TCP não foi observada pela XRD. De acordo com Kim e colaboradores (2005), a presença de fases de fosfato de cálcio na hidroxiapatita muitas vezes exibe uma combinação de bioatividade e estabilidade mecânica reforçada que é difícil de conseguir em materiais monofásicos. Isso faz com que esses materiais de substrato promissores de biocerâmica bifásica sejam aplicados na regeneração e reparo do tecido ósseo.

5.1.3- Espectroscopia no Infravermelho das hidroxiapatitas (IV)

A avaliação da composição química das nanopartículas de hidroxiapatita foi obtida utilizando a espectroscopia no infravermelho. A Figura 27 apresenta espectros típicos de IV para nanopartículas de HA (BAKAN, LAÇIN, SARAC, 2013; JILLAVERNKATESA, CONDRATE, 1997). Foram observadas bandas de estiramento a 1023 cm^{-1} e 1088 cm^{-1} , bem como as bandas de deformação angular a 503 cm^{-1} , 561 cm^{-1} e 600 cm^{-1} para o grupo fosfato (PO_4^{3-}) (CANGEMI et al., 2008; EL-BAHY, 2011). Pode-se ver claramente a partir da Figura 28 que, além das bandas típicas do grupo fosfato de HA, duas novas bandas apareceram em 1193 e 868 cm^{-1} , que podem ser atribuídas a flexão no plano do grupo OH e nos modos de alongamento P-(OH) dos grupos HPO_4^{2-} na estrutura, respectivamente (JILLAVERNKATESA, CONDRATE, 1997).

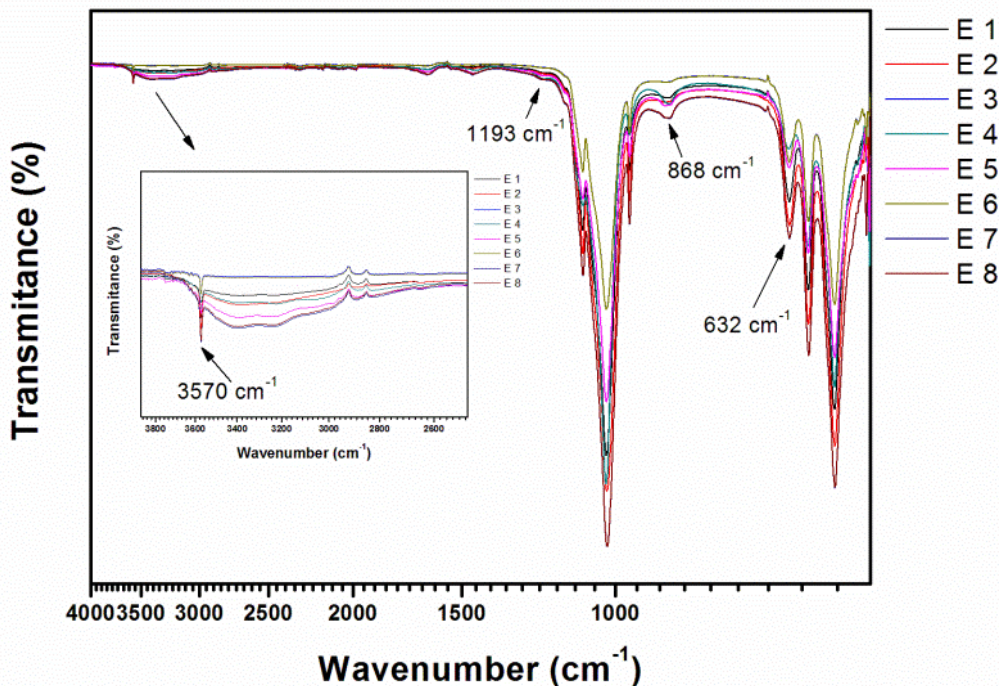


Figura 27. Espectros no FTIR para as nanopartículas de HA sintetizadas em diferentes condições experimentais

A presença de bases estruturais de grupos fosfato e hidroxila junto com cálcio confirmou a síntese completa de HA devido à presença da banda em 632 cm^{-1} e 3570 cm^{-1} (DHAND, RHEE, PARK, 2014), as bandas em cerca de 3570 cm^{-1} e 632 cm^{-1} eram assinaturas químicas características que representavam os índices estequiométricos apropriados para a síntese de nanopartículas de HA (BAKAN, LAÇIN, SARAC, 2013; DHAND, RHEE, PARK, 2014; JILLAVERNKATESA, CONDRATE, 1997). Wang e colaboradores (2018) atribuíram a banda estreita em cerca de 3600 cm^{-1} à presença do estiramento de O-H na estrutura cristalina da hidroxiapatita.

5.1.4- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A Figura 28 mostra as imagens de todas as nanopartículas sintetizadas. Pode-se observar que as nanopartículas apresentaram forma de bastões para todas as condições de síntese utilizadas. No entanto, no experimento E8, em que se utilizou maior temperatura, concentração e tempo de síntese, estes bastões foram maiores e mais finos do que as obtidas pelas outras condições. A imagem de MET da amostra E5 mostrou formato bastões com estruturas porosas provavelmente devido ao mecanismo de crescimento por coalescência orientada entre as nanopartículas com dimensões de cerca de 8 nm. As distribuições de tamanho são mostradas na Figura 29 e tabela 11.

Vários autores também relataram o crescimento direcionado das nanopartículas de hidroxiapatita ao longo do eixo c na direção do plano cristalográfico (002) formando nanopartículas em forma de bastões. Como observamos as nanopartículas de HA também mostraram crescimento orientado por meio do mecanismo de crescimento de coalescência orientado para direção (002), que foram confirmados tanto por medidas de DRX, quanto por imagens de MET. Esta coalescência pode ser claramente verificada nas imagens MET das amostras 5, onde se verifica que os bastões são de fato formados por partículas menores que, quando juntas, crescem orientadas na direção preferida (DHAND, RHEE, PARK, 2014; JOKIĆ *et al.*, 2011; ROVERI, 2010).

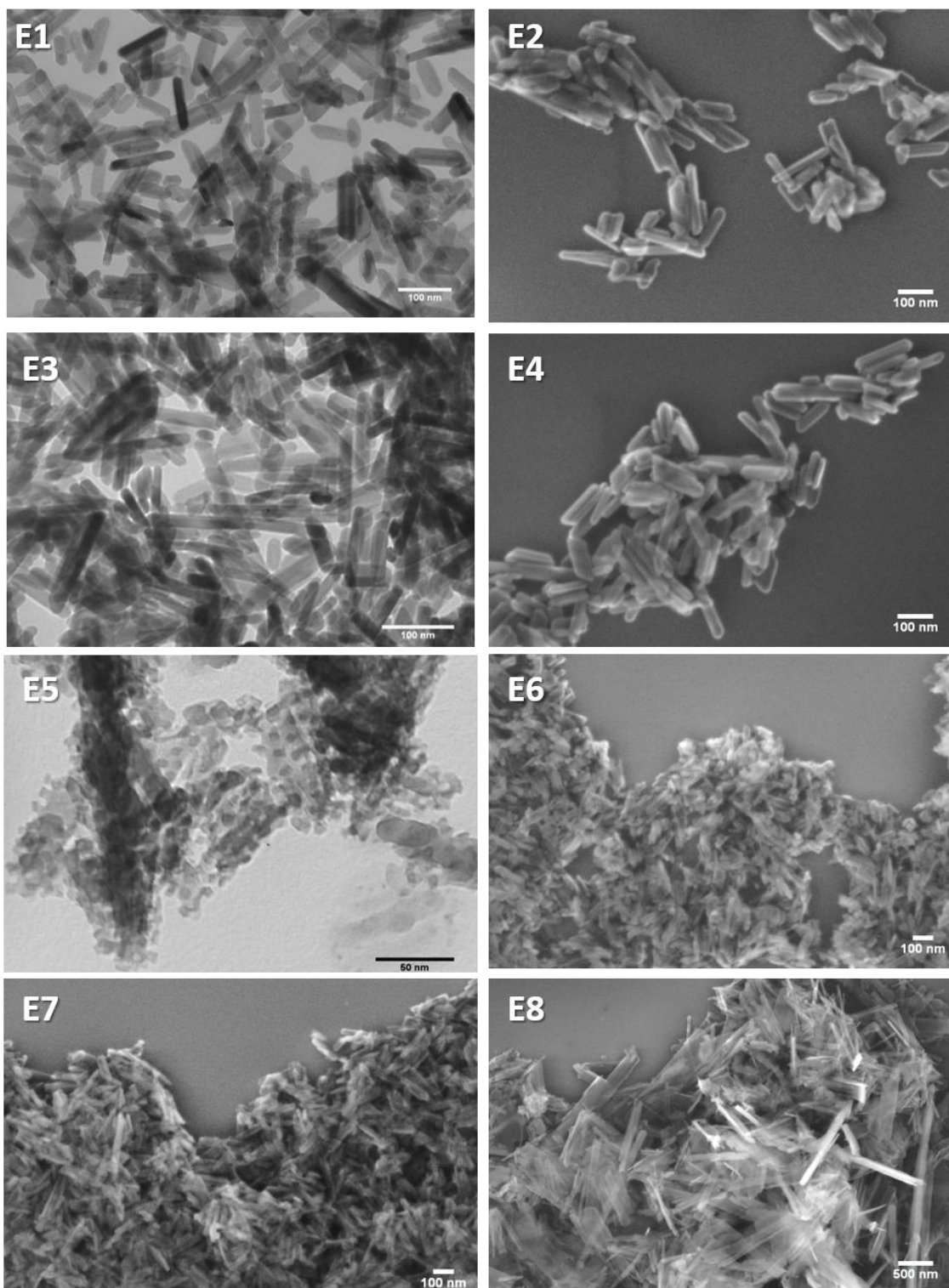


Figura 28. Imagens de microscopia da nanopartículas de HA sintetizadas nas diferentes condições experimentais apresentadas na tabela 9. E1 (MET, valor da barra de escala 100 nm), E2 (MEV, valor da barra de escala 100 nm), E3 (MET, valor da barra de escala 100 nm), E4 (MEV, valor da barra de escala 100 nm), E5 (MET, valor da barra de escala 50 nm), E6 (MEV, valor da barra de escala 100 nm), E7 (MEV, valor da barra de escala 100nm), E8 (MEV, valor da barra de escala 500 nm).

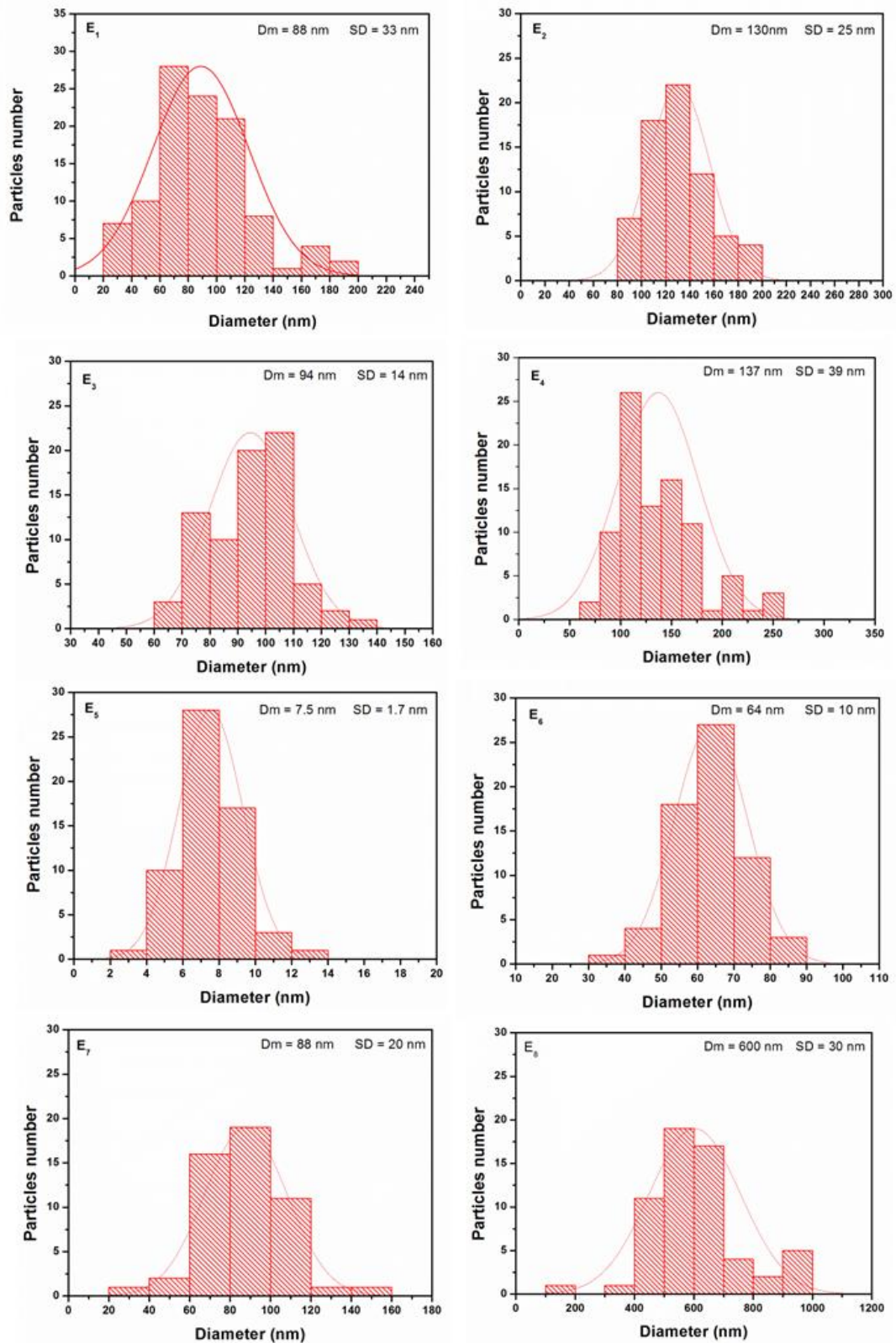


Figura 29. Histogramas da distribuição de tamanho das nanopartículas de hidroxiapatita obtidos por imagens de MEV e MET.

5.1.5- Planejamento fatorial 2³ da síntese hidrotérmica de nanopartículas de hidroxiapatita

A partir do projeto fatorial 2³, foram realizados oito experimentos, possibilitando o cálculo dos principais efeitos de interação, que são apresentados na tabela 11. A Figura 30 apresenta o gráfico Pareto para o projeto experimental. Nele é possível observar que todos os efeitos têm um valor positivo, indicando que o tamanho de partícula aumenta com o aumento do nível dos parâmetros estudados e também que todos os efeitos são significativos. Sete efeitos têm valores P inferiores a 0,05, indicando que são significativamente diferentes de zero no nível de confiança de 95,0%. A variável que mais influenciou o tamanho foi a temperatura. Nos experimentos 1 e 5, utilizaram-se baixas temperaturas e tempos curtos, o que gerou a formação de nanopartículas em formato de bastões por meio do crescimento orientado das nanoesferas. Nos experimentos em que foram utilizadas temperaturas mais altas, ocorreu uma indução da nucleação no eixo c, produzindo nanobastões, que podem ser explicados pelos processos de crescimento capilar e de amadurecimento de Ostwald (MANO *et al.*, 2015). Chen e colaboradores (2007) sintetizaram nanopartículas de HA por tratamento hidrotérmico e observaram a auto-organização de nanobastões de hidroxiapatita por meio da fixação orientada. Os nanobastões apresentaram crescimento preferencial na direção ao longo do eixo c da HA. Usando microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM), eles observaram que os cristais únicos de HA podem crescer na direção (0 0 2) da estrutura (CHEN *et al.*, 2007).

Tabela 11. Matriz do projeto fatorial e tamanho médio de partícula descrevendo as nanopartículas HA preparadas em cada experimento. A temperatura (T), tempo (t) e a concentração dos precursores (C) foram as variáveis estudadas. Os efeitos calculados para o projeto fatorial também foram apresentados.

Experimento	T	t	C	Tamanho da Partícula (nm)
1	-1	-1	-1	88 ± 33
2	+1	-1	-1	130 ± 25
3	-1	+1	-1	94 ± 14
4	+1	+1	-1	137 ± 39
5	-1	-1	+1	7,5 ± 1,7
6	+1	-1	+1	64 ± 10
7	-1	+1	+1	88 ± 20
8	+1	+1	+1	600 ± 30

Efeitos							
T	t	c	Tt	Tc	tc	Ttc	
163	157	77	114	121	151	114	

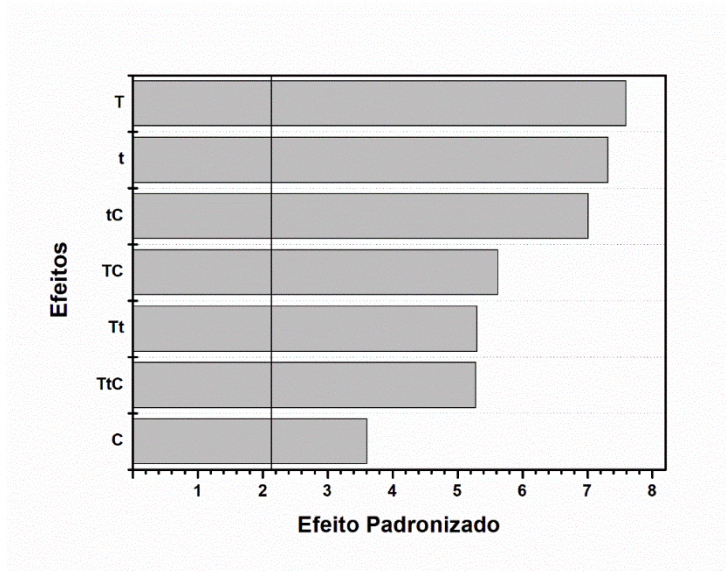


Figura 30. Gráfico de Pareto demonstrando os valores padronizados dos efeitos médio, secundários e terciários.

Para as oito condições experimentais independentes possíveis para um projeto fatorial 2^3 , poderiam ser calculados sete efeitos diferentes: três

interações individuais, três secundárias e uma terciária. Os efeitos rotulados E1, E2 e E3 foram considerados efeitos individuais e representam os efeitos respectivos apenas para cada fator isolado. Os efeitos E12, E13 e E23 mostram os efeitos combinados de dois fatores e o efeito denominado E123 denota os efeitos combinados dos três fatores do projeto fatorial. Somente os efeitos com valores superiores a 5% foram avaliados como significativos; portanto, todos os efeitos da temperatura (E1), do tempo (E2) e da concentração de sais (E3) e dos efeitos decorrentes da interação de fatores (E12), (E23) e (E13), bem como o efeito E123, podem ser considerados efeitos significativos e resultaram na proposição de um modelo de contabilização de um coeficiente independente (b_0) e sete coeficientes diferentes (b_1 , b_2 , b_3 , b_{12} , b_{13} , b_{23} , b_{123}) para cada um dos efeitos (Eq.3). Finalmente, ao resolver a equação da matriz $b = (X^tX)^{-1}X^tY$, obteve-se a Equação 2, que descreve o modelo.

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 \quad (4)$$

$$y = 151.08 + 81.67X_1 + 78.67X_2 + 38.83X_3 + 57.08X_1X_2 + 60.42X_2X_3 + 75.42X_1X_3 + 56.83X_1X_2X_3 \quad (5)$$

Nas Equações 4 e 5, a variável X_1 representa o valor codificado (-1 ou +1) da temperatura, X_2 representa o valor codificado do tempo e X_3 representa o valor codificado das concentrações do precursor (Tabela 9). Ao inserir os valores codificados de cada variável na Equação 4, foi possível calcular o tamanho de partícula preditivo para cada experiência e, conseqüentemente, comparar os valores previstos com os obtidos experimentalmente. O erro ou os resíduos podem ser avaliados. Os valores de tamanho de partícula previsto e os respectivos resíduos, em valores absolutos e percentuais, são exibidos na Tabela 12, que mostra a Análise de Variância (ANOVA). A tabela divide a variabilidade no tamanho de partícula em partes separadas para cada um dos efeitos. Em seguida, testa a significância estatística de cada efeito comparando o quadrado médio com uma estimativa do erro experimental.

Tabela 12. Tabela ANOVA para o modelo proposto.

Dado	Soma Quadrática	Df	Média Quadrática	Teste F	Teste P
Temperatura (T)	160148	1	160148	256.60	0.0000
Tempo (t)	148601	1	148601	238.10	0.0000
Concentração(c)	36153	1	36153	57.93	0.0001
Tt	78147	1	78147	125.21	0.0000
Tc	87664	1	87664	140.46	0.0000
tc	136580	1	136580	218.84	0.0000
Ttc	77463	1	77463	124.12	0.0001
Erro Total	5696	16	406.886		
Total (corr)	734744	23			

O valor de R^2 obtido indica que o modelo explica 95,0121% da variabilidade da resposta tamanho de partícula, a estatística R-quadrado ajustada, que é mais adequada para comparar modelos com diferentes números de variáveis independentes, foi de 92,8298% e o erro padrão da estimativa mostrou que o desvio padrão dos resíduos foi de 52,7082. O erro absoluto médio (MAE) de 22,3729 foi o valor médio dos resíduos, a estatística Durbin-Watson (DW) testa os resíduos para determinar se houve alguma correlação significativa com base na ordem em que eles ocorrem no arquivo de dados, uma vez que o valor P foi superior a 5,0%, não houve indicação de autocorrelação em série nos resíduos no nível de significância de 5,0%. O modelo foi estatisticamente significativo, uma vez que o efeito devido às concentrações de precursores (c) teve o menor valor padrão, foi possível produzir partículas com duas gamas diferentes em relação aos seus tamanhos, corrigindo c nos níveis superior ou inferior. Por exemplo, corrigindo o fator c para +1 (0,10 mol L⁻¹), houve uma tendência para produzir partículas maiores, enquanto as partículas menores deveriam ser corrigidas como c = -1 (0,03 mol L⁻¹).

Na Figura 31A pode-se observar que quando a concentração dos reagentes está no nível maior (+1), a superfície de resposta mostrou tamanhos

de partículas variando de 7,5 a 600 nm. Enquanto isso, na Figura 31B verifica-se que na condição de menor nível para concentração (-1) observa-se na superfície de resposta que são sintetizadas nanopartículas com tamanho variando entre 88 a 137 nm. Em resumo, as Figuras 31A e 31B mostram que, a partir do planejamento fatorial proposto e com o modelo obtido, foi possível controlar o tamanho das nanopartículas em faixas variando de 7,5 a 600 nm. Isso representa uma ótima ajuda para pesquisas futuras, uma vez que muitas aplicações de nanopartículas de HA dependem do tamanho de partículas diferentes.

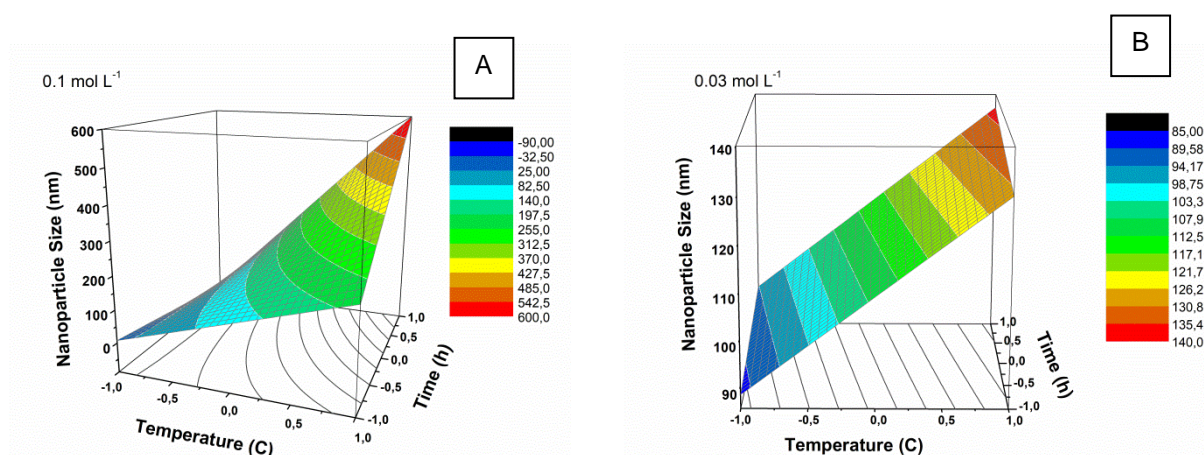


Figura 31. Superfície de resposta para o efeito tamanho das nanopartículas de hidroxiapatita. A) fixando a concentração dos sais no nível -1 ($0,03 \text{ mol L}^{-1}$) e B) fixando a concentração dos sais no nível +1 ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$).

Os resultados demonstraram que, em concentrações mais baixas, o aumento de temperatura foi o fator que apresentou o maior efeito sobre o modelo, afetando o tamanho das nanopartículas. Neste caso, nanopartículas com formato de bastões foram sempre obtidas. Na maior concentração, tanto o tempo como a temperatura influenciaram o tamanho das nanopartículas e resultaram em nanopartículas de diferentes formas. As sínteses com concentrações iniciais de reagentes mais altas ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), mostraram que o aumento do tempo e da temperatura resultaram em um aumento significativo no tamanho das nanopartículas. Além disso, a variação das condições iniciais alterou a forma das nanopartículas.

Jin e colaboradores (2015) estudaram o efeito da modificação do tempo e da temperatura na síntese hidrotermática de nanobastões de HA na presença de citrato de sódio e observaram que com o aumento da temperatura e do tempo, houve aumento no comprimento e largura dos bastões. Além disso, na faixa de temperatura estudada, eles observaram que os nanobastões de HA foram obtidos a partir de partículas primárias formadas na fase aquosa em vez de agregados ou grandes aglomerados. Kuśnieruk e colaboradores (2016) observaram que a morfologia das nanopartículas de HA dependia dos parâmetros de processo executados na síntese hidrotermática. Eles observaram que o aumento da temperatura de síntese leva a partículas de HA mais regulares e esféricas. Eles provaram que a síntese a baixa temperatura leva a cristais de HA com a morfologia tipo agulha, o que é confirmado pelos resultados MEV e MET. Pang e colaboradores (2003) sintetizaram nanopartículas de HA a baixas temperaturas e obtiveram partículas que eram ligeiramente mais finas e mais longas, mais irregulares, com bordas menos distintas. Além disso, essas partículas tendem a formar aglomerados. Também foi demonstrado que quanto maior a cristalinidade do pó, maior será a forma da partícula com o aumento da síntese de temperatura e tempo de amadurecimento.

De forma geral os resultados mostraram que a temperatura foi a principal força motriz para o crescimento dos cristais no processo hidrotérmico, e é um dos fatores-chave para a preparação de nanopartículas de hidroxiapatita tipo bastões. Temperaturas mais elevadas promovem o crescimento orientado. De acordo com Sadat-Shojai e colaboradores (2011) em temperaturas mais baixas, os contraíons, tais como K^+ , SO_4^{2-} e Cl^- , têm influência morfologia das nanopartículas. O uso de íons SO_4^{2-} leva a nano-plaquetas, possivelmente devido à forte interação entre os íons Ca^{2+} e SO_4^{2-} , enquanto os íons K^+ dificultaram o crescimento de nanocristais devido à interação entre íons K^+ e OH^- ou PO_4^{3-} . Os íons Cl^- podem ajudar a formar nanorods, possivelmente devido ao aumento da polaridade da solução. Este estudo demonstrou que as nanopartículas de hidroxiapatita com forma modificada podem ser preparadas usando os efeitos combinados de

temperatura e contra íons, que são simples, baratos e eco-amigáveis (DHAND, RHEE, PARK, 2014; WANG, WENG, WANG, 2010).

6. Conclusão Parcial

As nanopartículas de HA foram sintetizadas com sucesso pelo método hidrotérmico. A otimização de síntese foi realizada usando um planejamento fatorial onde foi possível controlar a forma e o tamanho das nanopartículas. Por meio desta abordagem foi possível construir um modelo matemático empírico, que permitiu criar uma superfície de resposta para mapear o sistema sintético.

As nanopartículas de HA foram compostas pela fase hexagonal pura. As imagens de MET e MEV, que também mostraram que as nanopartículas de HA possuíam formas de nanobastões bem definidas e distribuições de tamanho estreito com tamanhos entre 8 nm e 600 nm, formados por mecanismo de crescimento por coalescência orientada. As análises de espectroscopia Raman mostraram que a presença de fase β -TCP em nanopartículas de HA na condição experimental que se utilizou menores concentrações com tempo e temperatura no nível maior.

A análise morfológica das nanopartículas de HA demonstra que essas propriedades são afetadas pelas condições de síntese e o parâmetro principal para o crescimento de cristais no processo hidrotermal foi à temperatura. Esses resultados demonstram a possibilidade de maximizar o controle de síntese das nanopartículas de HA usando um planejamento fatorial.

7- Referencias

Almeida Filho, E.; Assis, C. M.; Vercik, L. O.; Guastaldi, A. C.; biomateriais: deposição de hidroxiapatita sobre superfície de Ti-CP modificada por aspersão térmica. **Química Nova**, v. 30, p. 1229-1232, 2007.

Arantes, T. M.; Pinto, A. H.; Leite, E. R.; Longo, E.; Camargo, E. R. Synthesis and optimization of colloidal silica nanoparticles and their functionalization with methacrylic acid. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 415, p. 209-217, 2012.

Askeland, D. R.; Phulé, P. P. **Ciência e Engenharia dos Materiais**. São Paulo: Cengage Learning, 2013, 594 p.

Bakan, F.; Laçin, O.; Sarac, H.; A novel low temperature sol–gel synthesis process for thermally stable nano crystalline hydroxyapatite. **Powder Technology**, v. 233, p. 295-302, 2013.

Barros Neto, B.; Sacarminio, I. S.; Bruns. R. E. **Como fazer experimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001. 480p.

Barton, A. F. M. Solubility parameters. *Chemistry Review*, v. 75, p. 731-753, 1975.

Cakić, S. M.; Ristić, I. S.; Ristić, O. Z. **Chapter 5: Thermal Analysis of Polyurethane Dispersions Based on Different Polyols**. *book edited by Fahmina Zafar and Eram Sharmin, ISBN 978-953-51-0726-2, Published: August 29, 2012*.

Bhattacharjee, P.; Naskar, D.; Maiti, T. K.; Bhattacharya, D.; Kundu, S. C. Non-mulberry silk fibroin grafted poly (ϵ-caprolactone)/nano hydroxyapatite nanofibrous scaffold for dual growth factor delivery to promote bone regeneration. **Journal of Colloid and Interface**, v. 472, p. 16-33, 2016.

Cai, Y.; Tang, R. Calcium phosphate nanoparticles in biomineralization and biomaterials. **Journal of Materials Chemistry**, v. 18, p. 3775-3787, 2008.

Cangemi, J. M.; Santos, A. M.; Claro Neto, S. E. Chierice, G. O. Biodegradation of Polyurethane Derived from Castor Oil. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 03, p. 201-206, 2008.

Chen, J. D.; Wang, Y. J.; Wei, K.; Zhang, S. H., Shi, X. T. Self-organization of hydroxyapatite nanorods through oriented attachment. **Biomaterials**, v. 28, p. 2275-2280, 2007.

Chen, Z.; Fu, Y.; Cai, Y.; Yao, J. Effect of amino acids on the crystal growth of hydroxyapatite. **Materials Letters**, v. 68, p. 361-363, 2012.

Choi, D.; Marra, K. G; Kumta, P. N. Chemical synthesis of hydroxyapatite/poly(ϵ-caprolactone) composites. **Materials Research Bulletin**, v. 39, p. 417-432, 2004.

Dhand, V.; Rhee, K. Y.; Park, S. J. The facile and low temperature synthesis of nanophase hydroxyapatite crystals using wet chemistry. **Materials Science and Engineering C**, v. 36, p. 152-159, 2014.

Dorozhkin, S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, v.31, p. 1465-1485, 2010.

El-Bahy, G. S. Characterization of In Situ Prepared Nano-Hydroxyapatite/Polyacrylic Acid (HAp/PAAc) Biocomposites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 122, p. 3270-3276, 2011.

Feng, Q. L.; Cui, F. Z.; Wang, H.; Kim, T. N.; Kim, J. O. Influence of solution conditions on deposition of calcium phosphate on titanium by NaOH-treatment. **Journal of Crystal Growth**, v. 210, p. 735-740, 2000.

Gao, Y.; Masuda, Y.; Ohta, H.; Koumoto, K. Room-Temperature Preparation of ZrO₂ Precursor Thin Film in an Aqueous Peroxozirconium-Complex Solution, **Chemistry Materials**, v. 16, 2615-2622, 2004.

Gao, S.; Sun, K.; Li, A.; Wang, H. Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanofiber by chemical precipitation method using surfactants. **Materials Research Bulletin**, v. 48, p. 1003-1006, 2013.

Guastaldi, A. C. Engineering of the surface of titanium for biomedical applications. *Metalurgia and Materials*, v. 59, p. 442, 2003.

Hatzor, A.; Weiss, P. S. Molecular Rulers for Scaling Down Nanostructures. **Science**, v. 291, p. 1019-1020, 2001.

Hench, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74 (7), p. 1487-1510, 1991.

Jillavenkatesa, A; Condrate, R. A. The Infrared and Raman Spectra of Tetracalcium Phosphate (Ca₄P₂O₉). **Spectroscopy Letters**, v.30, p.1561-1570, 1997.

Jin, X.; Chen, X.; Cheng, Y.; Wang, L.; Hu, B.; Tan, J. Effects of hydrothermal temperature and time on hydrothermal synthesis of colloidal hydroxyapatite nanorods in the presence of sodium citrate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 450, p. 151-158, 2015.

Jin, X.; Zhuang, J.; Zhang, Z.; Guo, H.; Tan, J. Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanorods in the presence of sodium citrate and its aqueous colloidal stability evaluation in neutral pH. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 443, p. 125-130, 2015.

Jokić, B.; Mitrić, M.; Radmilović, V.; Drmanić, S.; Petrović, R.; Janačković, D. Synthesis and characterization of monetite and hydroxyapatite whiskers obtained by a hydrothermal method. **Ceramics International**, v. 37, p. 167-173, 2011.

Kim, H.; Camata, R. P.; Vohra, Y. K.; Lacefield, W. R. Control of phase composition in hydroxyapatite/tetracalcium phosphate biphasic thin coatings for biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, p. 961-966, 2005.

Leena, M.; Rana, D.; Webster, T. J.; Ramalingam, M. Accelerated synthesis of biomimetic nano hydroxyapatite using simulated body fluid. **Materials Chemistry and Physics**, v. 180, p. 166-172, 2016.

Langford, J. I.; Wilson, A.J.C. Seherrer after Sixty Years: A Survey and Some New Results in the Determination of Crystallite Size. **Journal of Applied Crystallography**, v. 11, p. 102-113, 1978.

Kuśnieruk, S.; Wojnarowicz, J.; Chodara, A.; Chudoba, T.; Gierlotka, S.; Lojkowski, W.; Influence of hydrothermal synthesis parameters on the properties of hydroxyapatite nanoparticles. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 7, p. 1586-1601, 2016.

Manoj, M.; Subbiah, R.; Mangalaraj, D.; Ponpadian, N.; Viswanathan, C.; Park, K. Influence of Growth Parameters on the Formation of Hydroxyapatite (HAp) Nanostructures and Their Cell Viability Studies. **Nanobiomedicine**, v. 2, p. 1-11, 2015.

Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Deming, S. N.; Michotte, Y.; Kaufman, L. **Chemometrics – A Textbook**, Elsevier, Amsterdam, 1988.

Murakami, S.; Kato, K.; Enari, Y.; Kamitakahara, M.; Watanabe, N.; Ioku, K. Hydrothermal synthesis of porous hydroxyapatite ceramics composed of rod-shaped particles and evaluation of their fracture behavior. **Ceramics International**, v. 38, p. 1649-1654, 2012.

Nosenko, N. V.; Strutynska, N.; Vorona, I.; Zatovsky, I.; Dzhagan, V.; Lemishko, S.; Epple, M.; Prymak, O.; Baran, N.; Ishchenko, S.; Slobodyanik, N.; Prylutskyy, Y.; Klyui, N.; Temchenko, V.; *Nanoscale Res. Lett.*, v. 10, p. 464, 2015.

Okada, M.; Furuzono, T. Low-temperature synthesis of nanoparticle-assembled, transparent, and low-crystallized hydroxyapatite blocks. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 360, p. 457-462, 2011.

Pang, Y. X.; Bao, X. Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 23, p. 1697-1704, 2003.

Peng, X.; Wickham, J.; Alivisatos, A. P. Kinetics of II-VI and III-V Colloidal Semiconductor Nanocrystal Growth: "Focusing" of Size Distributions, **Journal American Chemical Society**, v. 120, p. 5343-5344, 1998.

Poole, Jr., C. P.; Owens, F. J. **Introduction to nanotechnology**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003. 400 p.

Rongchao J.; Cao, Y. C.; Hao, E.; Me´traux, G. S.; Schatz, G.C.; Mirkin, C. A.; "Controlling anisotropic nanoparticle growth through plasmon excitation"; **Nature**, v. 425, n. 2, p. 487-490, 2003.

Roveri, N.; Palazzo, B.; Iafisco, M. The role of biomimetism in developing nanostructured inorganic matrices for drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5(8), 861-877, 2008.

Roveri, N.; Iafisco, M. Evolving application of biomimetic nanostructured hydroxyapatite. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 3, p. 107-125, 2010.

Rudolph, W. W.; Irmer, G. Raman and Infrared Spectroscopic Investigations on Aqueous Alkali Metal Phosphate Solutions and Density Functional Theory Calculations of Phosphate–Water Clusters. **Applied Spectroscopy**, v. 61, 1312-1327, 2007.

Sadat-Shojai, M.; Atai, M.; Nodehi, A. Design of Experiments (DOE) for the Optimization of Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite Nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 571-582, 2011.

Sandhu, A.; Who invented nano? **Nature Nanotechnology** v. 1, p. 87, 2006.

Sauer, G. R.; Zunic, W. B.; Durig, J. R.; Wuthier, R. E. Fourier Transform Raman Spectroscopy of Synthetic and Biological Calcium Phosphates. **Calcified Tissue International**, v. 54, p. 414-420, 1994.

Scherrer, P. Estimation of the size and internal structure of colloidal particles by means of röntgen, *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen*, v. 26, p. 98, 1918.

Shackelford, J. F. **Ciência dos Materiais**. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2008. 556 p.

Shin, H.; Jo, S.; Mikos, A. G. Biomimetic materials for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, p. 4353-4364, 2003.

Storz, O.; Gasthuber, H.; Woydt, M. Tribological properties of thermal-sprayed Magneli-type coatings with different stoichiometries (Ti_nO_{2n-1}). **Surface and Coatings Technology**, p. 76-81, v. 140, 2001.

Tampieri, A.; Celotti, G.; Landi, E. From biomimetic apatites to biologically inspired composites. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 568-576, 2005.

Valimaa, T.; Laaksovirta, S. Degradation behaviour of self-reinforced 80L/20G PLGA devices in vitro. **Biomaterials**, v. 25, p. 1225-1232, 2004.

Varadarajan, N.; Balu, R.; Rana, D.; Ramalingam, M.; SampathKumar, T. S. Accelerated Sonochemical Synthesis of Calcium Deficient Hydroxyapatite Nanoparticles: Structural and Morphological Evolution. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, v. 4, p. 295-299, 2014.

Wang, M.; Qian, R.; Bao, M.; Gu, C.; Zhu, P. Raman, FT-IR and XRD study of bovine bone mineral and carbonated apatites with different carbonate levels. **Materials Letters**, v. 210, p. 203-206, 2018.

Wang, L.; Weng, L.; Wang, L.; Song, S.; **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 118, p. 1195-1198, 2010.

Wang, H.; Li, Y.; Zuo, Y.; Li, J.; Ma, S.; Cheng, L. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/ polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 28, p. 3338-3348, 2007.

Wijesinghe, W.P.S.L.; Mantilaka, M.M.M.G.P.G.; Premalal, E.V.A.; Herath, H.M.T.U.; Mahalingam, S.; Edirisinghe, M.; Rajapakse, R.P.V.J.; Rajapakse, R.M.G. Facile synthesis of both needle-like and spherical hydroxyapatite nanoparticles: Effect of synthetic temperature and calcination on morphology, crystallite size and crystallinity. **Materials Science and Engineering C**, v. 42, p. 83-90, 2014.

Zanchet, D.; Moreno, M. S.; Ugarte, D. Anomalous packing in thin nanoparticle supercrystals, *Physical Review Letters*, v. 82, n. 26, p. 5277-5280, 1999.

Zarbin, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, V. 30, N^o. 6, p. 1469-1479, 2007.

Zhao, X. Y.; Zhu, Y. J.; Lu, B. Q.; Chen, F.; Qi, C.; Zhao, J.; Wu, J.; Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanorods using pyridoxal-5'-phosphate as a phosphorus source. **Materials Research Bulletin**, v. 55, p. 67-70, 2014.

Parte C: Síntese e Caracterização de Nanocompósitos de Poliuretana com Nanopartículas de Hidroxiapatita e Nanocelulose

1- Introdução

Os avanços tecnológicos, especialmente na medicina, proporcionaram um aumento da expectativa de vida humana nos últimos anos (KANO, 2011). Para aumentar a qualidade de vida dessa população idosa, a ideia de reconstrução de órgãos e tecidos por materiais sintéticos ganhou proeminência (LANGER, TIRRELL, 2004; LYSAGHT, HAZLEHURST, 2004). Esses materiais que buscam substituir ou aumentar os tecidos ou órgãos do corpo são chamados de biomateriais (BAIGHOMAN, 1996; GRIFFITH, 2000; KANETO *et al.*, 1995; LANGER, TIRRELL, 2004; LYSAGHT, HAZLEHURST, 2004; SHIN, JO, MIKOS, 2003). Eles devem ser capazes de orientar os processos de restauração da funcionalidade que levam ao tecido não prejudicial ao organismo (GRIFFITH, NAUGHTON, 2002; LANGER, TIRRELL, 2004).

Entre os biomateriais, os implantes temporários, feitos de polímeros bioabsorvíveis, ganharam cada vez mais importância no campo médico (GRIFFITH, 2000). Os mais estudados são a policaprolactona, poli (ácido láctico) (WAN, WEN, 2005) e a polivinilpirrolidona (PVP). Um polímero biocompatível, pouco estudado, que suscitou grande interesse é o poliuretano (PU). Um dos principais objetivos da pesquisa científica hoje é a busca de fontes renováveis derivadas de materiais poliméricos que possuem boas propriedades físicas e mecânicas, juntamente com os biomateriais de hidroxiapatitas, compatíveis com o corpo humano (MAKHAEVA, TENHU, KHOKHLOV, 2003; PICH *et al.*, 2003).

O óleo de rícino é obtido a partir da semente da mamona (*ricinus communis*), da família *Euphorbiaceae*, consiste na maioria dos triglicerídeos do ácido ricinoleico (LOOS *et al.*, 2003). Para os segmentos de poliuretanos (PU) é considerado um polioli natural. Juntamente com o grupo diisocianato leva poliuretanos biodegradáveis e bioreabsorvíveis. Por meio destes poliuretanos

podem ser formados biomateriais o que prova ser totalmente compatível com os organismos vivos (WAN, WEN, 2005). Devido a este comportamento as PUs podem ser usadas para inúmeras aplicações biomédicas, como regeneração óssea, suporte de enzimas, implantes para o crescimento celular (LOOS *et al.*, 2003) e como cartilagem artificial e tendões (SANNA *et al.*, 2013).

Materiais para implantes devem ser biocompatíveis e biofuncionais. Também devem possuir resistência mecânica para suportar os esforços a que o indivíduo é normalmente exposto. Nesse sentido, o uso de materiais nanocompósitos permite a combinação da flexibilidade dos materiais poliméricos com a resistência mecânica das cerâmicas. Além disso, a presença de uma nanopartícula, como a hidroxiapatita, pode melhorar a bioatividade devido à presença de grupos hidroxílicos de superfície que facilitam as interações intermoleculares e a adesão celular (GRANDFRILD, GUSTAFSSON, PALMQUIST, 2103; SOMORJAI *et al.*, 2009). A hidroxiapatita possui uma estrutura química similar à porção mineral de osso, favorecendo a osteocondutibilidade e a osteoindutibilidade (ALMEIDA *et al.*, 2007; FENG *et al.*, 2000; STORZ, GASTHUBER, WOYDT, 2001).

Assim, neste trabalho, preparamos nanocompositos PU com nanopartículas de hidroxiapatita e/ou nanopartículas de celulose para sua aplicação como biomaterial. As vantagens deste tipo de material são inumeráveis, uma vez que o PU é biocompatível, biodegradável e biorreabsorvível. As nanopartículas de HA promoveram a catálise do processo de osteointegração e melhoram as propriedades termomecânicas do polímero.

2- Referencial Teórico

2.1- Polímeros

Polímeros são definidos como macromoléculas que apresentam unidades repetitivas, chamadas de monômeros. Os polímeros podem ser classificados quanto à estrutura molecular como linear, ramificado e em rede (reticulado). Os polímeros também podem ser classificados quanto ao tipo de

monômeros como homopolímero, onde somente um tipo de monômero está presente na cadeia polimérica, e copolímeros, onde mais de um monômero está presente na cadeia polimérica.

Os polímeros são muito usados pela indústria devido à alta flexibilidade e alta resistência ao impacto. São menos densos que metais ou cerâmicas. São processados em baixas temperaturas, podem apresentar maior resistência à corrosão. Dependendo do tipo do processo de síntese podem apresentar porosidade e isso confere ao polímero baixa densidade e alta permeabilidade de gases. No geral os polímeros permitem ajuste fino das propriedades por meio da modificação com aditivos inorgânica, como fibras, plastificantes e expansores.

2.1.1- Poliuretanas (PU)

Poliuretana é uma classe de polímeros caracterizada pela ligação uretano, formada pela reação do grupo isocianato com o grupo hidroxila (SULEMAN *et al.*, 2014). As unidades de uretano (Figura 32) não são regulares, sendo representadas por suas unidades monoméricas principais, o di-isocianato e o polioliol, não representando todos os tipos de ligação que fazem parte do domínio do polímero (SOARES, 2012).

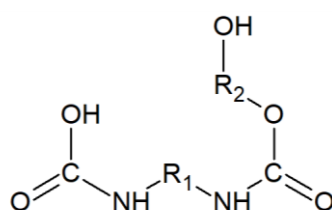


Figura 32. Representação geral do grupo uretano.

Na síntese de poliuretanas ocorre uma reação de adição entre um isocianato (di ou poli) e um composto que possui hidrogênio ativo, normalmente um polioliol, responsável pela formação de ligações uretano sendo considerada uma reação de propagação em cadeia. A Figura 33 mostra uma representação da reação.

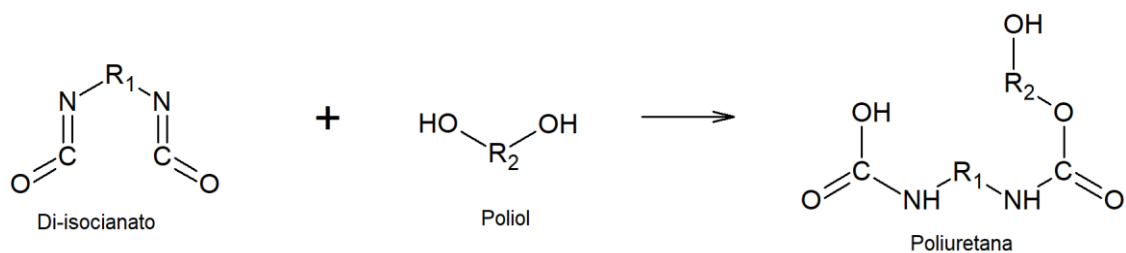


Figura 33. Síntese de poliuretanas.

Durante a reação de polimerização ocorrem reações paralelas entre o isocianato e água produzindo o ácido carbâmico que se decompõe em amina e dióxido de carbono (Figura 34) que atua como agente de expansão durante a polimerização (SOARES, 2012). Essa dispersão de gás dá origem à formação de pequenas cavidades, interligadas em uma estrutura tridimensional (MONTEAVARO, 2005).

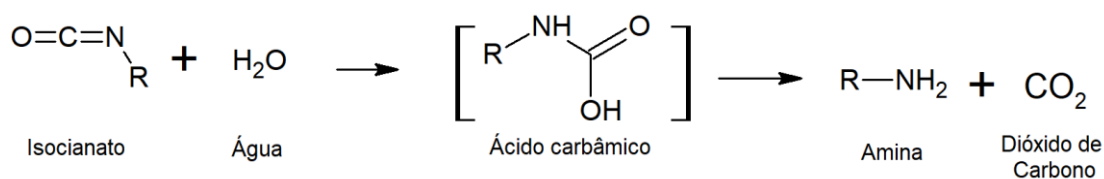


Figura 34. Reação entre o isocianato e a água.

Outras reações paralelas ocorrem durante a polimerização, como a reação entre o isocianato e a amina, formando ureia di-substituída que é responsável pela formação de segmentos rígidos de poliuréia (Figura 35). Reações secundárias nas quais ligações uretânicas reagem com os isocianatos formando alofanatos e ligações biuretos aumentam as ramificações e as reticulações da matriz polimérica (Figuras 36 e Figura 37). O excesso de grupos NCO irá reagir com os hidrogênios ativos dos grupos uretano ou ureia formando as ligações reticuladas alofanato e biureto e garantir maior grau de reticulação das espumas de poliuretano (SOARES, 2012; VILAR, 2002). As PU's necessitam ser pós-curadas, em temperatura elevada durante tempos curtos, ou temperatura ambiente durante longos tempos. Durante a pós-cura os grupos NCO remanescentes nas extremidades das cadeias das PU's reagem

com grupos ureia e uretano formando ligações cruzadas alofanato e biureto (VILAR, 2002).

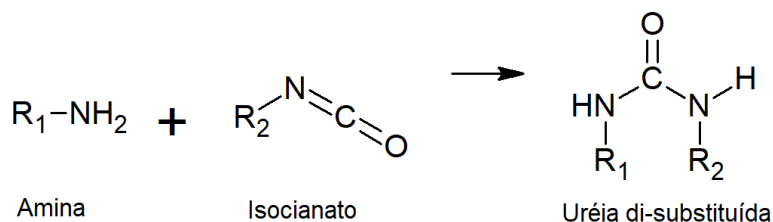


Figura 35. Reação de formação de uréia di-substituída.

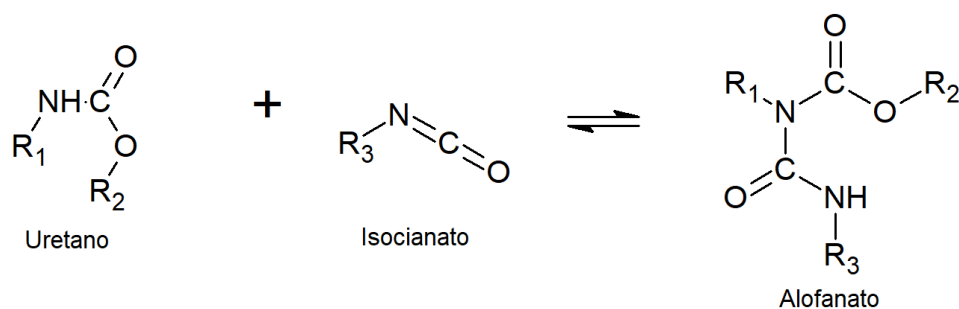


Figura 36. Reação de formação de alofanatos.

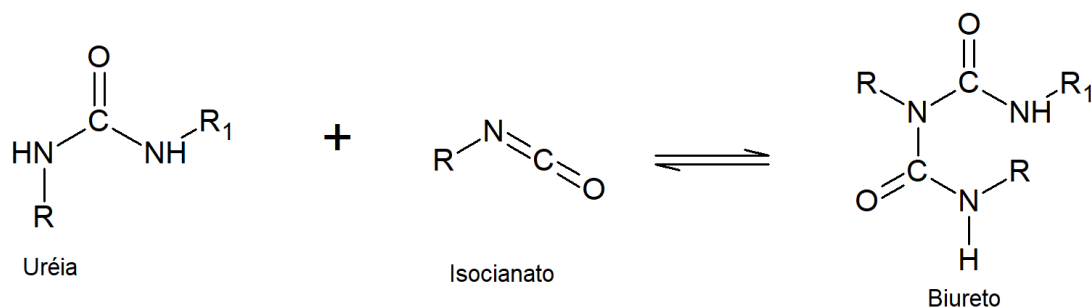


Figura 37. Reação de formação de biuretos.

As espumas poliuretanas podem ser classificadas como flexíveis ou rígidas, dependendo da escolha do poliálcool. As flexíveis são preparadas a partir de poliálcoois de massa molecular elevada e baixo grau de funcionalidade, variando de 1,8 a 3. Para as espumas rígidas o poliálcool deve apresentar massa molecular baixa e alta funcionalidade, de 3 a 12 (SULEMAN *et al.*, 2014; VILAR, 2002).

As espumas flexíveis de poliuretano possuem células abertas, permeáveis ao ar, são reversíveis à deformação e podem ser produzidas numa

grande faixa de propriedades incluindo maciez, firmeza e resiliência (VILAR, 2002).

2.1.2.1- Isocianatos

Os isocianatos possuem o grupo NCO que reage com compostos que possuam hidrogênio ativos, como os polióis, a água, os extensores de cadeia. Os isocianatos podem ser aromáticos, alifáticos, ciclo-alifáticos ou policíclicos. Os isocianatos mais utilizados comercialmente são: tolueno diisocianato (TDI) (2,4-diisocianato de 1-metil-benzeno e 2,6-diisocianato de 1-metil-benzeno, Figura 38) representa 31% do setor; e difenil metano diisocianato (MDI) (1,1'-metileno bis (4-isocianato benzeno); 1-isocianato-2-(4-isocianato fenil) metilbenzeno; 1,1'-metileno bis (2-isocianato benzeno, Figura 39), que corresponde a 66% do mercado de PUs (SOARES, 2012).

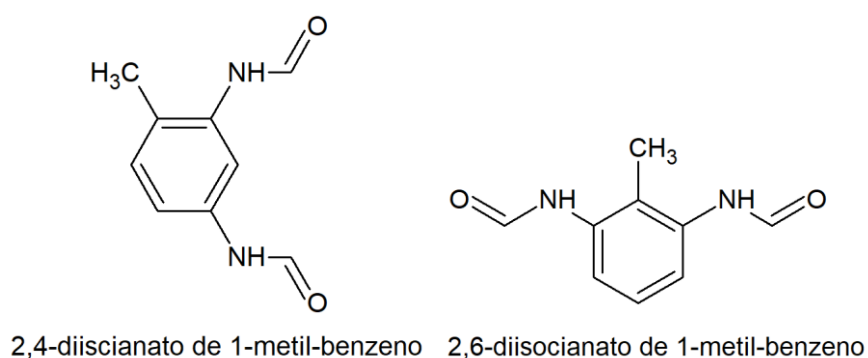
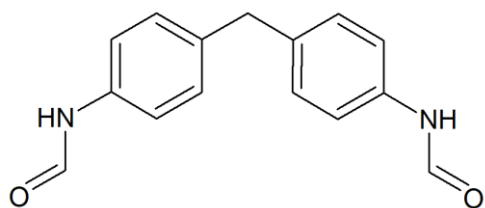
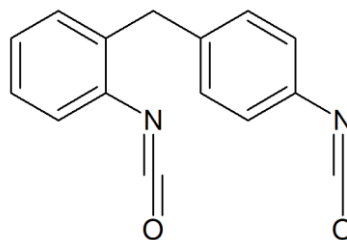


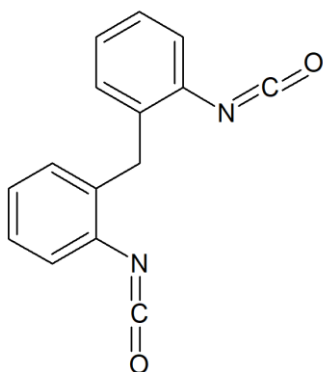
Figura 38. TDI - mistura de isômeros 2,4-diisocianato de 1-metil-benzeno e 2,6-diisocianato de 1-metil-benzeno.



1,1'- metileno bis (4-isocianato benzeno)



1-isocianato-2-(4-isocianato fenil)metilbenzeno



1,1'-metileno bis(2-isocianato benzeno)

Figura 39. MDI mistura de isômeros 1,1'-metileno bis (4-isocianato benzeno); 1-isocianato-2-(4-isocianato fenil) metilbenzeno; 1,1'-metileno bis (2-isocianato benzeno).

O TDI é um isocianato com funcionalidade igual a dois ($f = 2,0$) e apresenta maior reatividade do grupamento NCO localizado na posição quatro do anel aromático em relação aos grupos NCO nas posições dois e seis. A mistura não destilada de MDI's, conhecida como MDI cru, ou MDI polimérico, possui funcionalidade média de 2,5 a 3,0 e é composta dos isômeros 4,4'-difenilmetano diisocianato, os 2,4' e 2,2', bem como dos produtos de condensação com mais de dois anéis aromáticos. Esta mistura é usada principalmente na produção de espumas rígidas onde provê vantagens em processabilidade e desempenho mecânico, como resistência mecânica e estabilidade dimensional da espuma (VILAR, 2002).

2.1.2.2- Polióis

Poliol é um termo utilizado para classificar compostos contendo hidroxila que reagem com grupos isocianatos para produzir poliuretanas (ZHANG,

HOURSTON, 1998). Os polióis utilizados na produção de poliuretana são predominantemente hidroxipoliéteres. Eles são produzidos por reação de alcoilação. Dependendo do grau de reticulação das PUs requeridas, os alcoóis de partida utilizados para hidroxipoliéteres podem ser glicóis divalentes (etileno, propileno e outros glicóis) ou alcoóis multivalentes (por exemplo, glicerol, sacarose). Os epóxidos utilizados são geralmente óxido de propileno e óxido de etileno. Além dos polióis poliéteres, temos: os polióis poliésteres alifáticos utilizados em aplicações de alta desempenho. Os polióis poliéster aromáticos usados em espumas rígidas; os polióis obtidos de óleos naturais; o polibutadieno líquido hidroxilado SULEMAN *et al.*, 2014; VILAR, 2002).

No mercado de poliuretanas cresce a procura por polióis obtidos de fontes renováveis, como os óleos naturais, em função da substituição total ou parcial de matérias-primas de origem petroquímica (JAIN *et al.*, 2008; ZHANG, HOURSTON, 1998). Dentre estes os polióis de origem vegetal que podem ser usados na fabricação de poliuretanas podemos destacar: o óleo de mamona, os polióis derivados do óleo de mamona e os obtidos a partir de óleos vegetais poli-insaturados, que pela utilização de vários métodos químicos têm as duplas ligações convertidas a grupos hidroxilas originando polióis com estruturas variadas (JAIN *et al.*, 2008).

2.1.2.2.1- Óleo de mamona

O óleo de mamona está presente em teores de 40 a 50% na semente da planta *Ricinus Communis*, da família Euphorbiaceae, que é encontrada em regiões tropicais e subtropicais, muito abundante no Brasil. O óleo de mamona é um líquido viscoso (viscosidade 500 - 800 cP a 25°C), de odor forte, obtido pela prensagem das sementes ou por extração com solvente (VILAR, 2002). O óleo de mamona é constituído essencialmente por triglicerídeos do ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxi-cis-9-octadecenóico), 90%, sendo os restantes 10% constituídos de ácidos graxos não hidroxilados, principalmente dos ácidos oleicos (3,5%) e linoleicos (4,5%). O ácido ricinoleico possui 18 átomos de carbono e é diferente dos outros ácidos graxos porque apresenta uma hidroxila

no carbono-12, e por apresentar uma dupla ligação cis entre os carbonos nove e 10 (CANGEMI, SANTOS, NETO, 2009; MERLINI, 2011, VILAR, 2002), conforme apresentado na Figura 40.

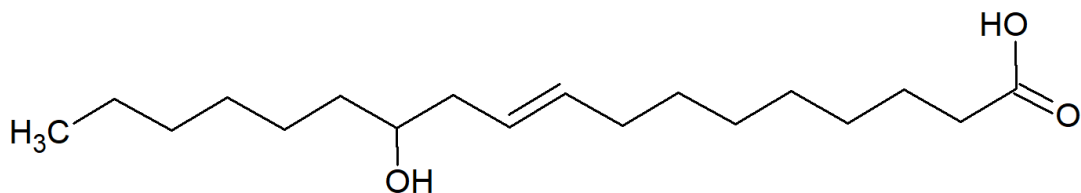


Figura 40. Ácido ricinoleico principal composto do óleo de mamona

Essas características estruturais e funcionais faz com que o óleo de mamona seja um poliálcool natural trifuncional, ativando a molécula tornando-a acessível a muitas reações químicas, possuindo funcionalidade média de aproximadamente 2,7. O valor de hidroxilas é da ordem de 163 mg de KOH/g para o produto, com grande pureza, recomendado para emprego em PU's (MERLINI, 2011; VILAR, 2002). Considerado um poliálcool/ glicerol natural junto com o grupo diisocianato dá origem às poliuretanas biodegradáveis e biorreabsorvíveis, por meio destas poliuretanas podem ser formados os biomateriais que demonstra ser totalmente compatível com organismos vivos (CANGEMI et al., 2006; CANGEMI et al., 2008; IGNÁCIO et al., 1996).

O óleo de mamona puro é utilizado em teores de até 20%, junto com o poliálcool poliéter na fabricação de espumas flexíveis em bloco, e em encapsulamento elétrico eletrônico (VILAR, 2002).

2.2- Nanocompósitos Poliméricos

Um material compósito, natural ou sintético, pode ser descrito como todo aquele que é formado por duas ou mais fases separadas por uma interface, de tal forma que algumas das suas propriedades sejam modificadas como resultado da interação destas distintas fases (SCHUBERT; HUSING; LORENZ, 1995). Este comportamento sinérgico entre as fases constituintes do material compósito pode ser tanto positiva (resultando no aumento da intensidade de uma dada propriedade) quanto negativa (com redução da intensidade). O

benefício de se inibir ou intensificar uma dada propriedade depende do tipo de aplicação que se espera dar a este material compósito.

Com o advento da nanotecnologia, que pode ser entendida como a síntese, manipulação e exploração de materiais em nanoescala, um dos focos é a obtenção de nanocompósitos (NAM *et al.*, 2001; ROY; KOMARNENI; ROY, 1984). Mesmo em pequenas quantidades, a presença destes reforços nanométricos promovem melhorias nas propriedades mecânicas, térmicas, e físico-químicas dos polímeros em comparação aos polímeros puros e aos compósitos tradicionais (WANG *et al.*, 2001). A dispersão em nível nanométrico aumenta a área de contato entre o reforço e a matriz polimérica, melhorando a compatibilidade entre as mesmas, originando materiais com maior resistência mecânica, maior estabilidade térmica ou com propriedades ópticas, magnéticas ou elétricas melhoradas quando comparadas aos compósitos tradicionais (WINEY; VAIA, 2007; ESTEVES; TIMMONS; TRINDADE, 2004). Tudo isso mantendo ou melhorando as características de processabilidade dos polímeros possibilitando o uso destes materiais pela indústria (WIEBECK; HARADA, 2005).

Os nanocompósitos costumam ser classificados pelo tipo de nanopartículas incorporadas, que variam desde típicas esferas até fibras ou placas bidimensionais de espessura nanométrica, como aquelas conseguidas por meio do esfolhamento de argilas (KUMAR *et al.*, 2007; SCHMALJOHANN, 2006). Diversas nanopartículas podem ser utilizadas no desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos, como por exemplo, esferas de sílica ou de óxido de titânio, ou nanofibras, nanobastões e nanotubos de carbono, e ainda nanopartículas lamelares, em que apenas a espessura encontra-se na faixa de alguns nanômetros, enquanto que seu comprimento e largura podem estar na faixa de micrometros (ROY; KOMARNENI; ROY, 1984; WANG *et al.*, 2001; PAUL; ROBESON, 2008; ALEXANDRE; DUBOIS, 2000).

Quando se trata dos nanocompósitos utilizando o PNVCL como matriz, destaca-se o uso de nanopartículas de silicatos (LOIZOU *et al.*, 2005), argila (LIANG; LIU; GONG, 2000), nanopartículas de ouro (BEIJA; MARTY; DESTARAC, 2011), nanopartículas magnéticas (LIU *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2009), grafeno (ALZARI *et al.*, 2011; SANNA *et al.*, 2012) e *nanowhiskers* de

celulose (SANNA *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2011). Diferentes comportamentos foram observados, como a melhoria nas propriedades mecânicas, propriedades de barreira, melhor processabilidade, diminuição na cristalinidade, entre outras. Contudo, deve-se atentar ao fato que o reforço inorgânico adicionado em um polímero biocompatível não pode interferir de forma drástica na biocompatibilidade do material final (DEWEZ *et al.*, 1998; NITZ *et al.*, 2001).

3- Objetivos

O objetivo foi sintetizar nanocompósitos poliméricos com nanopartículas de hidroxiapatita ou nanocelulose como agentes de reforços, e estudar também o efeito da inserção das duas nanopartículas na matriz polimérica para serem utilizados como biomateriais.

4. Materiais e Métodos

4.1- Síntese de polioli derivado do óleo de mamona

Petzhold e colaboradores (2011) propuseram a produção de poliois em uma única etapa, compreendendo a transesterificação de óleos vegetais com glicerina na presença de um catalisador básico. O teor de OH do óleo de mamona pode ser aumentado pela transesterificação com compostos polihidroxilados como a glicerina (VILAR, 2002). Inicialmente foi obtido um polioli, feito com óleo de mamona (Castor oil, Aldrich) e glicerol, usando KOH como catalisador. Em um béquer foram adicionados 250g de óleo mamona, 47g de glicerina e 0,4% de hidróxido de potássio, colocados sob agitação a uma temperatura de 150°C por duas horas.

4.2- Síntese das poliuretanas e nanocompósitos

Poliuretanas (PU) foram sintetizadas pela técnica *one-shot*, Figura 41, onde todos os reagentes, o polioli do óleo de *ricinus communis*, o TDI (mistura

de isômeros) e água deionizada (agente de reticulação e de expansão), foram misturados, a 60 °C, até formação de espuma. Depois a mistura foi transferida para um molde de silicone e colocada em estufa a 100°C por 1h para cura do polímero. Os nanocompositos foram preparados por polimerização *in situ* de PU na presença de nanopartículas de HA (1%, 5% ou 10%) e na presença de nanopartículas de celulose (0,5%). Foram sintetizados também nanocompósitos de poliuretana contendo 0,5% de nanopartículas de HA e 0,5% de nanopartículas.

Para a síntese dos nanocompósitos foi escolhido à amostra de nanocelulose NC50%2, que mostrou a melhor condição de síntese considerando tamanho e homogeneidade. A amostra escolhida de hidroxiapatita foi o experimento cinco que apresentou nanopartículas de HA com formas de nanorod bem definidas e distribuições de tamanho estreito com dimensões em torno de 5 nm (largura) e 10 nm (comprimento).

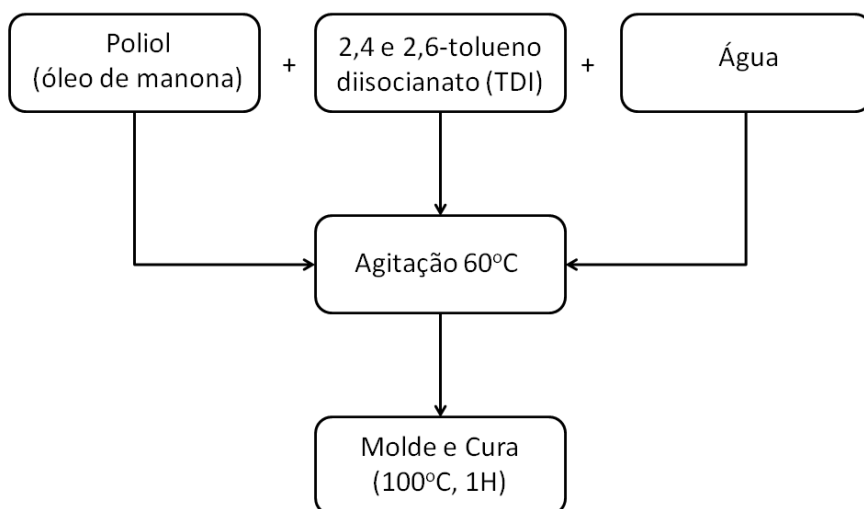


Figura 41. Técnica *one-shot* para obtenção das poliuretanas.

4.3- Caracterizações dos nanocompósitos poliméricos

4.3.1- Espectroscopia no Infravermelho (IV) dos Polímeros

Os espectros foram adquiridos pela técnica de reflexão total atenuada (ATR) em um espectrômetro de absorção no infravermelho Bruker Vertex 70

equipado com o acessório PLATINUM ATR UNIT A 225. As amostras foram colocadas sobre uma célula de diamante (2 x 2 mm), operando no modo de reflexão simples com um ângulo de interação de 45°. Os espectros foram adquiridos na faixa espectral de 400 – 4000 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} , sendo cada espectro o resultado da média de 64 medidas.

4.3.2- Calorimetria Diferencial de Varredura

Os termogramas foram obtidos pela técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC), usando um equipamento Shimadzu DSC-60 PLUS. As medidas foram realizadas no intervalo de temperaturas de -100 a 240 °C, usando uma taxa de aquecimento de 20°C/min, fluxo de nitrogênio 200 mL/min e cadinhos de alumínio selado.

4.3.3- Análise Termogravimétrica (TGA) dos Polímeros

Os termogramas foram obtidos pela técnica de análise térmica diferencial e termogravimétrica, usando um equipamento Shimadzu DTG-60H. As medidas foram realizadas no intervalo de temperatura de 25 a 650 °C, usando taxa de aquecimento de 10 °C/min, fluxo de nitrogênio de 200 mL/min e cadinhos de platina de 70 μL , usando aproximadamente 8mg da amostra.

4.3.4- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos Polímeros

As amostras foram fixadas com tinta de carbono sobre porta amostras de latão, e recobertas com ouro como material condutor. As imagens foram obtidas com um microscópio eletrônico de varredura (MEV) *Jeol JSM-IT300* operado em alto vácuo, com tensão de aceleração de elétrons de 4 kV.

4.3.5- Ensaios de viabilidade celular

4.3.5.1- Cultivo Celular

As células de fibroblasto embrionário de murinos (MEF) foram descongeladas e cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm², contendo meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco), gentamicina (Gibco)(0,025 g L⁻¹L), estreptomicina/penicilina (Gibco) (0,1 g L⁻¹) e enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), em uma estufa a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após atingirem confluência, foi realizada a quantificação da viabilidade celular pelo método de exclusão por Azul de Tripán. As células inviáveis ficaram coradas e as demais permaneceram incolores e foram contadas em Câmara de Neubauer.

4.3.5.2- Teste de proliferação celular

Para o teste de proliferação celular, utilizamos o método colorimétrico de redução do brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difenil tetrazólio (MTT). Os poços da placa de poliestireno foram utilizados como controle positivo. As amostras de PU puro e as amostras preparadas com 1% e 5% de nanopartículas de HA foram cortadas em folhas de cobertura circulares de modo a preencher a área do poço. As amostras foram dispostas em 4 colunas e em 4 placas de poliestireno estéril de 96 poços, separadas de acordo com os intervalos de tempo em que foram analisados (24 e 48 horas). Para os tempos de 24h e 48h foram inoculados 50 mL de concentrado celular (1x10³ células/mL) diretamente nas amostras usando a concentração de 1x10² células/mL. Todos os poços receberam 100 µl de DMEM em sequência e foram incubados a 37°C numa atmosfera úmida com 5% de CO₂. O meio de cultura foi substituído a cada 24h. Transcorridos os tempos experimentais, os poços foram lavados com DMEM. Após a lavagem, foram adicionados 100µL de MTT (2mg mL⁻¹) em cada poço, seguindo-se de um período de incubação de 3 horas nas mesmas condições. Posteriormente, o MTT foi retirado e cada poço foi preenchido com 150µL do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos precipitados de formazan. Por último, realizou-se a leitura da absorbância no comprimento de onda 540 nm, em equipamento Synergy H1 da Biotek, por

meio do qual foi possível mensurar a quantidade de formazan produzida, diretamente proporcional à atividade metabólica e ao número de células vivas.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nanocompósitos de poliuretanas à base de óleo de mamona e 2,4 e 2,6-tolueno diisocianato (TDI), de origem comercial, com hidroxapatita e/ou nanocelulose foram preparados com a finalidade de determinar qual compósito promissor para a aplicação como biomaterial. Os nanocompósitos foram caracterizados morfológica e estruturalmente por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de infravermelho (FTIR). Os materiais também foram caracterizados quanto às suas propriedades térmicas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e termogravimétrica (TGA). Por fim, a bioatividade dos nanocompósitos poliméricos foi testada pelo crescimento e adesão de células.

Nas Figuras 42 até 43 são apresentadas as imagens de microscopia ótica das amostras de poliuretanas e nanocompósitos. Essas imagens foram obtidas em um Microscópio Digital Modelo: Digital Microscópio, Electronic Magnifier, X Zhang Eletronicos-EEP. As amostras foram cortadas longitudinalmente e as superfícies foram tingidas e visualizadas em um aumento aproximadamente 40 vezes para facilitar a análise comparativa dos poros. Todas as espumas obtidas apresentaram coloração amarela e não apresentaram a alteração na cor devido ao uso de nanopartículas. As espumas exibiram células (poros) abertas e apresentaram-se macias e flexíveis. A distribuição das células na matriz mostrou-se irregular para todas as amostras, como podem ser observadas nas imagens onde a superfície foi tingida, no fundo do molde as células aparecem mais abertas e disformes já na superfície aparece mais uniformes e menores, a diferença do tamanho dos poros em sua composição pode ser explicada pelo fato de que as moléculas de CO₂ geradas no fundo encontraram uma maior resistência à expansão, pois além do volume de poliuretana acima delas existe a parede do recipiente impedindo seu deslocamento. Pacheco e colaboradores (2007) atribuíram à homogeneidade

das microcélulas formadas ao método de expansão adotado (expansão em molde fechado).

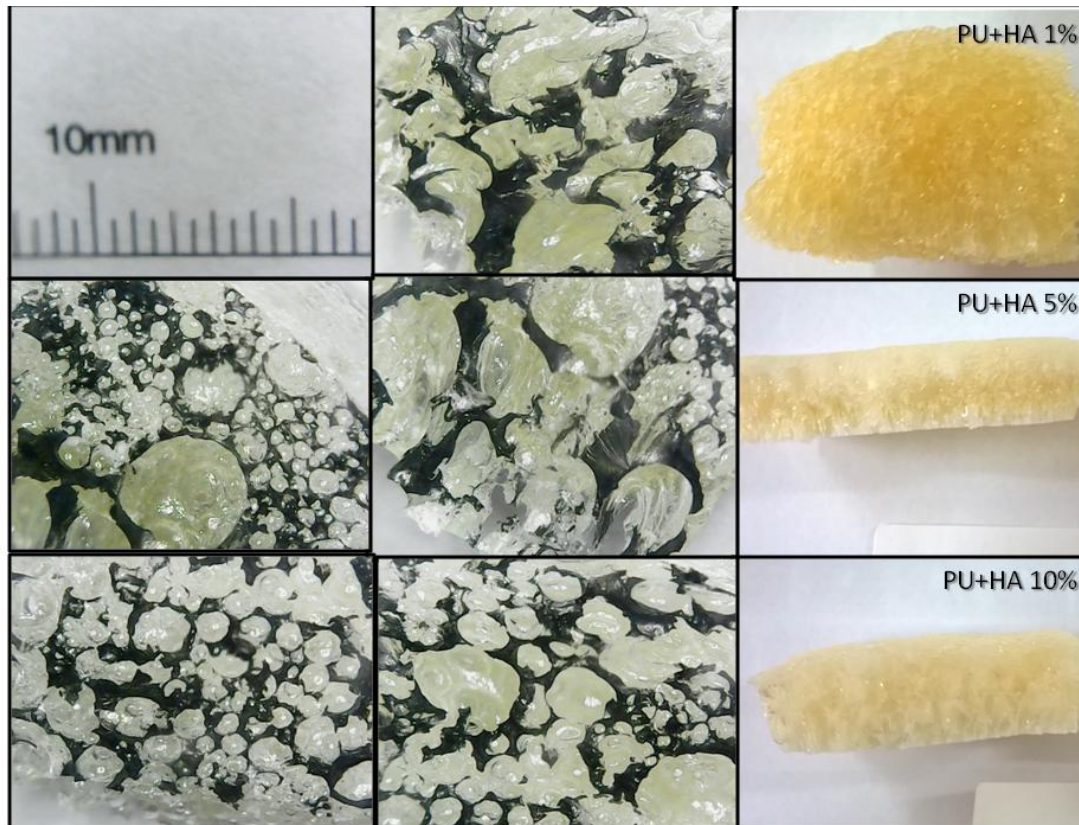


Figura 42. Imagens de microscopia ótica e a correspondente fotografia dos nanocompósitos de poliuretana e nanopartículas de hidroxiapatita obtidos.

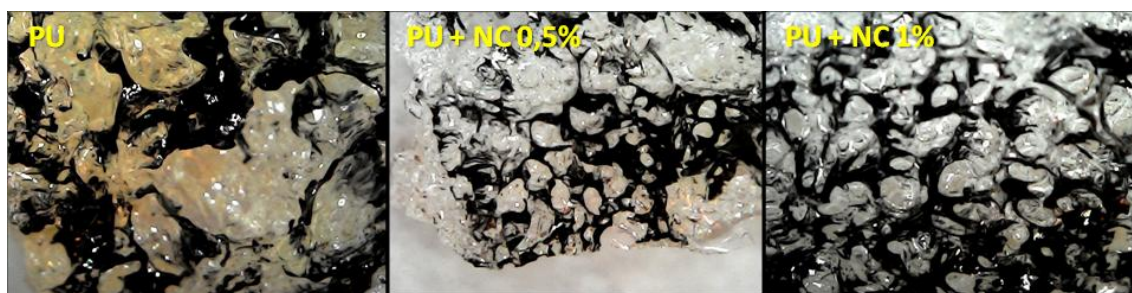


Figura 43. Imagens de microscopia ótica dos nanocompósitos de poliuretana e nanocelulose obtidos.

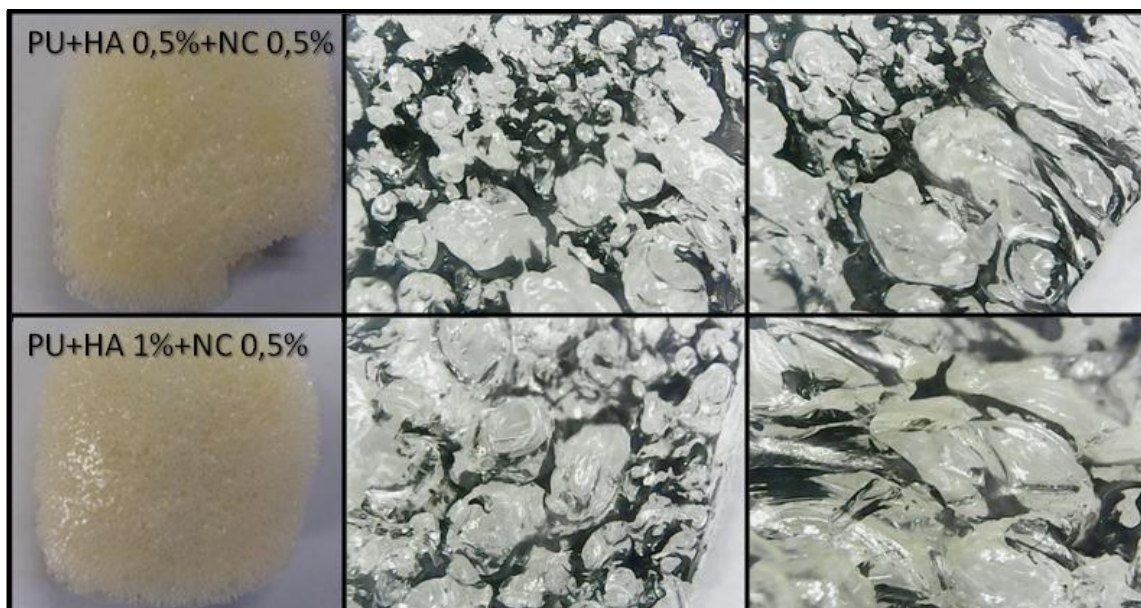


Figura 44. Imagens dos nanocompósitos de poliuretana e nanopartículas de hidroxiapatita e nanocelulose obtidos.

5.1- Caracterização dos polímeros puros e dos nanocompósitos de poliuretana

5.1.1- Espectroscopia no Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho (FTIR) é importante para a caracterização das poliuretanas, onde a mesma mostra os grupos funcionais que caracteriza esse material, podendo assim confirmar a síntese do material pretendido (SILVA, 2013). Os espectros de FTIR da poliuretana e dos Nanocompósitos PU/HA, PU/NC e PU/NC/HA são mostrados na Figura.

A polimerização completa do monômero foi mostrada por espectros típicos de FTIR em todas as amostras estudadas. A presença da ligação de uretano foi observada em todos os espectros de FTIR do nanocompósito PU, PU/HA, PU/NC e PU/NC/HA, mostrados na Figura 44. Os espectros de IV apresentam bandas características da ligação N–H de uretano, sendo elas referente ao estiramento em 3367cm^{-1} e da deformação em 1537cm^{-1} (BADRI *et al.*, 2010; CORISH, 1959; PEI *et al.*, 2011; SILVERSTEIN, 1994; TROVATI *et al.*, 2010).

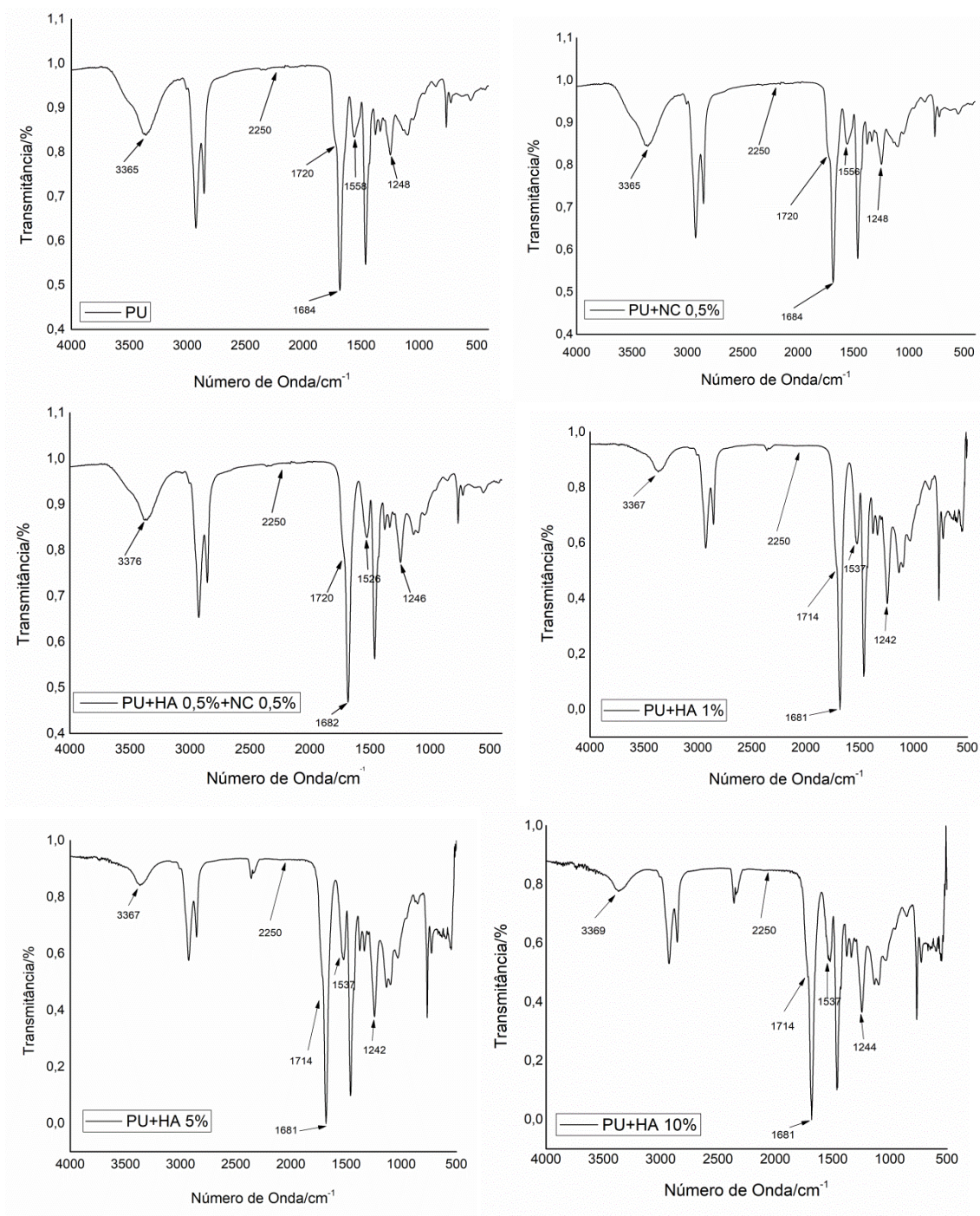


Figura 45. Espectros de infravermelho da poliuretana e dos nanocompósitos de poliuretana com nanopartículas de hidroxiapatita e nanocelulose.

A banda de deformação característica do grupo N=C=O livre residual em torno de 22505 cm⁻¹ não é encontrada em nenhum dos espectros, confirmando a reação total entre os grupos N=C=O do TDI com o polioli do óleo de mamona

e com a água (usada como extensor de cadeia) o que é desejado, já que $\text{N}=\text{C}=\text{O}$ livre é tóxico e a existência de $\text{N}=\text{C}=\text{O}$ livre pode gerar reações secundárias indesejáveis (por exemplo, com a água gerando ácido carbâmico que se decompõe para dar como produto final ureia). Nas regiões de 2926 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} observam-se as bandas características de estiramento assimétrico e simétrico de CH_3 , respectivamente. Um alargamento na banda atribuída ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ (1714 e 1648 cm^{-1}) foi observado nos espectros, em função da sobreposição com a banda de estiramento $\text{C}=\text{O}$ de grupo éster (uretano) e estiramento $\text{C}=\text{O}$ devido à ureia. A banda de estiramento em 1244 cm^{-1} pode ser atribuída à ligação ($\text{CO}-\text{O}$) do grupo uretano. Demonstrando assim a polimerização completa (BADRI *et al.*, 2010; CORISH, 1959; PEI *et al.*, 2011; SILVERSTEIN, 1994; TROVATI *et al.*, 2010).

5.1.2- Análise térmica dos polímeros e nanocompósitos

5.1.2.1- Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) tem por objetivo determinar a temperatura de transição vítrea (T_g) e a temperatura de fusão (T_m) de um polímero. A temperatura de transição vítrea é uma transição onde não há mudança de estado físico, as cadeias das regiões amorfas adquirem progressivamente mobilidade com o aquecimento. A temperatura de fusão (T_m) é uma mudança de estado físico e corresponde a fusão da parte cristalina de um polímero (Mano, Mendes, 2004). Na Figura 46 encontram-se as curvas de DSC da poliuretana e dos nanocompósitos. A tabela 13 mostra os valores da transição vítrea (T_g), para os nanocompósitos poliuretana com nanocelulose e hidroxiapatita e para o polímero puro.

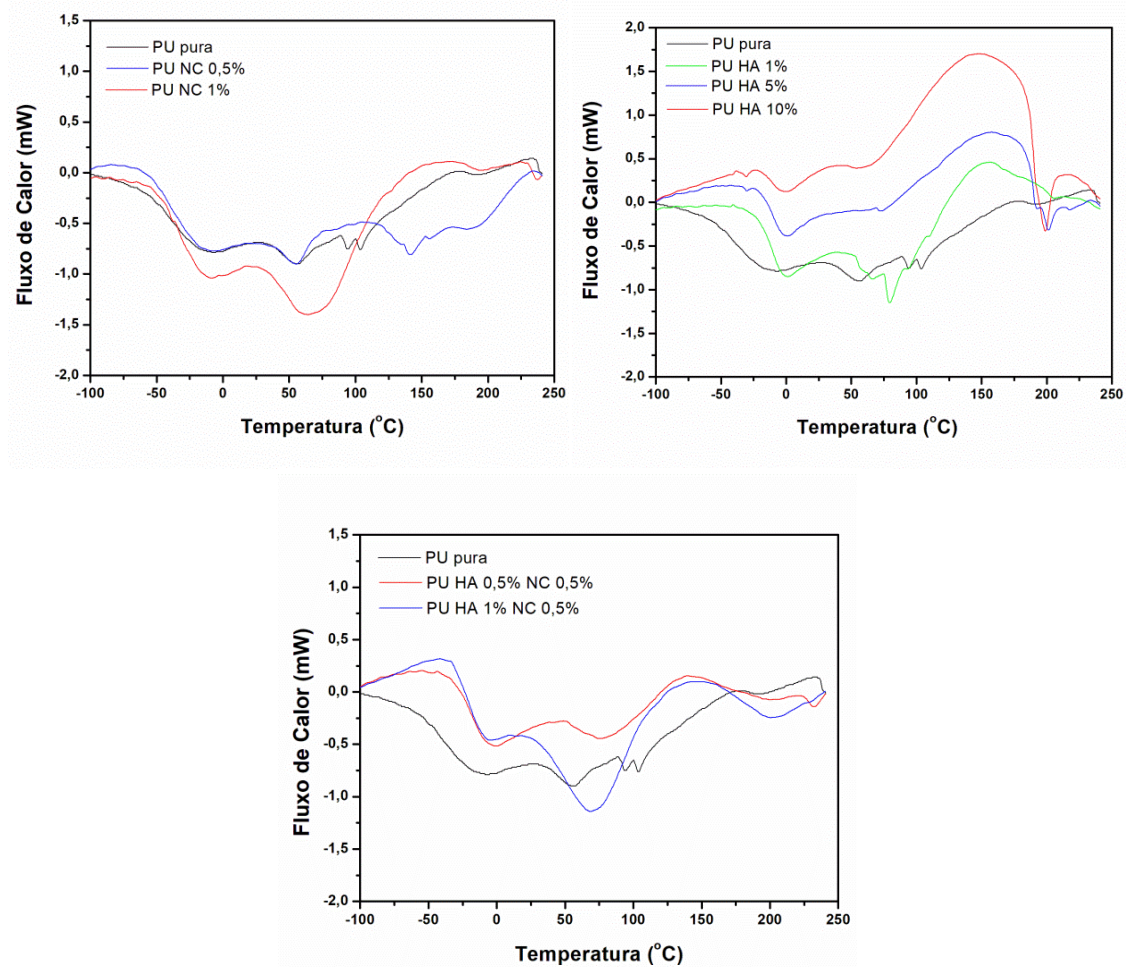


Figura 46. Curvas de DSC para a poliuretana pura e dos nanocompósitos.

Tabela 13. Valores de Tg (°C) determinadas para os nanocompósitos por meio das curvas de DSC.

Amostra	TG
PU pura	-38,7
PU + HA 1%	-12,5
PU + HA 5%	-11,2
PU + HA 10%	-10,5
PU + NC 0,5%	-35,5
PU + NC 1%	-32,8
PU + HA 0,5% + NC 0,5%	-19,9
PU + HA 1% + NC 0,5%	-19,8

A temperatura de transição vítrea (T_g) mostra uma tendência de um leve aumento para todos os nanocompósitos de poliuretana com nanocelulose em relação à poliuretana pura, sugerindo uma leve diminuição na mobilidade das cadeias poliméricas. Este aumento pode ser atribuído a uma restrição na mobilidade das cadeias poliméricas pelas partículas de nanocelulose. Para os nanocompósitos de poliuretana com nanopartícula de hidroxiapatita em relação à poliuretana pura houve um aumento na T_g foi mais pronunciado sugerindo uma maior interação atrativa entre as nanopartículas e os polímeros. Um aumento na T_g dos nanocompósitos de polímero argila, também foi verificado por Alexandre e Dubois (2000).

O aumento na T_g para os nanocompósitos de poliuretana com nanopartícula de hidroxiapatita pode demonstrar que os nanocompósitos ficaram mais rígidos quando comparados ao polímero puro e aos nanocompósitos de poliuretana com nanocelulose, ocasionado por reações de intercruzamento de cadeias poliméricas (*cross-linking*, ou ligação cruzada). Ocorre uma reticulação polimérica, o que pode ser verificado por meio do cálculo da T_g dos nanocompósitos nas medidas de DSC. Com o aumento da reticulação, a estrutura se torna mais rígida e menos solúvel em solventes orgânicos. Silva (2014) observou que as espumas provenientes do polioli petroquímico apresentaram temperaturas de transição vítrea superiores às espumas oriundas de polióis vegetais. Este comportamento foi atribuído ao efeito plastificante das cadeias saturadas presentes no polioli vegetal.

Serves (2007) estudou as propriedades de espumas flexíveis de poliuretanas sintetizadas a partir de tolueno diisocianato (TDI) e polióis à base de óleo de mamona modificadas com diversas concentrações de óxido de etileno, em seu trabalho foi observado T_g para todas as espumas decresce com aumento de massa molar do polioli utilizado para formulá-la, de -30 até -45.

Adicionalmente, pode ser observado nas curvas de DSC da PU pura, para os nanocompósitos com hidroxiapatita e no nanocompósito contendo 0,5% de NC a presença de um duplo pico endotérmico entre 100°C e 210°C,

que é causada pela fusão dos segmentos rígidos (termoplástico) (POMPE *et al.*, 1998). Além disso, em todas as amostras verifica-se a presença de um pico endotérmico em torno de 65 °C (MAZUR *et al.*, 2008) e que provavelmente estão relacionados também a fusão de segmentos semicristalinos, sendo verificado comumente em PUs com cadeias mais complexas e desordenadas, mais ramificadas (YAMAKI *et al.*, 2002; YEGANEH *et al.*, 2005)

5.1.2.2- Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas DTG mostram que existem diferentes estágios de degradação não perceptíveis nas curvas TG, mostrando a relação estreita e influência mútua entre o processo de degradação dos segmentos rígidos e flexíveis para as poliuretanas (CAKIĆ *et al.*, 2012). Os resultados obtidos para a degradação térmica dos polímeros e dos nanocompósitos são mostrados na Figura 47.

Pode-se observar que as espumas exibiram três estágios de degradação, mais evidentes na curva derivada. O primeiro é observado em aproximadamente 340°C, que correspondente à degradação de segmentos rígidos formados por ligações uretânicas N-H e C-O, de baixa força de ligação, levando a formação de CO₂, aminas, CO e aldeídos. O segundo grupo, relacionado à degradação dos segmentos flexíveis, com o máximo do pico em aproximadamente em 440°C. O outro pico é atribuído à degradação das cadeias dos polióis vegetais, a 470°C, estão relacionados à quebra das ligações C-C, C-O, C-H, C=C e C=O, as quais apresentam maior força de ligação e estão relacionados com segmentos flexíveis (CAKIĆ *et al.*, 2012; JIÃO *et al.*, 2013; SOMANI *et al.*, 2003).

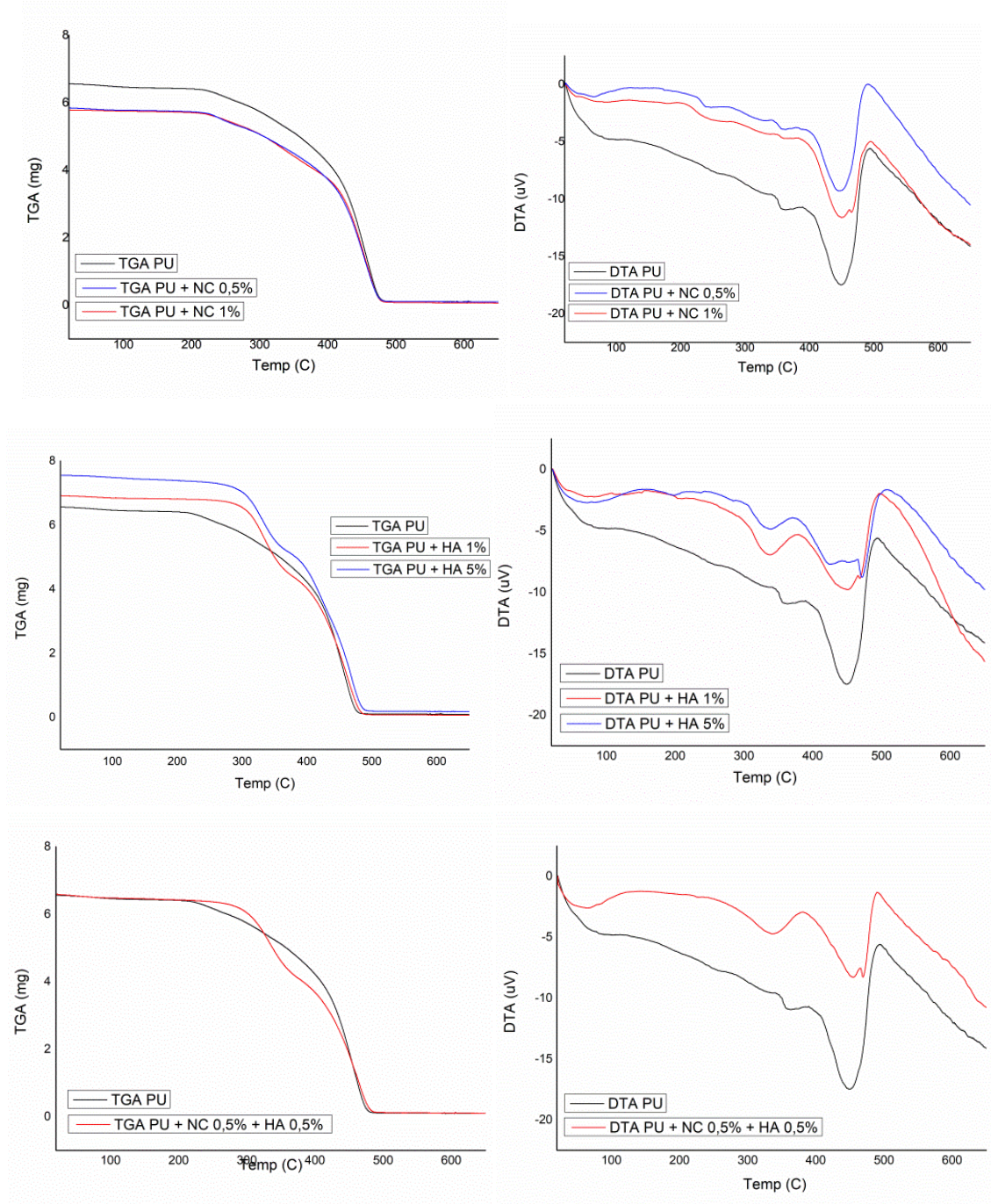


Figura 47. Curvas de TGA e DTA das amostras de poliuretana e dos nanocompósitos.

Na tabela 45 estão mostrados os dados de temperatura de início de degradação (T_{ONSET}) e a temperatura do término da degradação (T_{ENDSET}), onde se encontram os picos dos gráficos de DTG. Como pode ser observado na tabela 14 o nanocompósito de poliuretana que contém nanopartículas de

hidroxiapatita mostrou T_{ONSET} maior que a poliuretana pura, este comportamento sugere que o uso da nanopartícula como aditivo promoveram aumento na estabilidade térmica das poliuretanas. Já para os nanocompósito contendo apenas nanocelulose foi observado a T_{ONSET} ligeiramente menor sugerindo uma diminuição na estabilidade térmica. Este comportamento provavelmente se deve a sua composição não ter boa interação com a matriz poliuretânica. Comparando os nanocompósito contendo as duas nanopartículas com a poliuretana pura conclui-se que o uso das duas nanopartículas como cargas promoveram aumento na estabilidade térmica das poliuretanas. Souza (2013) estudou o efeito da adição de nanocelulose no comportamento térmico em poliuretanas à base de poli(ϵ -Caprolactona) e observaram uma temperatura de início de degradação (T_{onset}) praticamente igual à poliuretana pura, 222,49 e 222,74°C respectivamente.

Tabela 14. Dados de temperatura de início de degradação (T_{ONSET}) e temperatura do término da degradação (T_{ENDSET}).

Amostra	T_{onset} (°C)	T_{endset} (°C)
PU	235	481
PU + NC0,5%	234	482
PU + NC1%	232	482
PU + HA1%	291	488
PU + HA5%	292	491
PU + NC 0,5% + HA 0,5%	286	486

5.2- Caracterização morfológica dos polímeros e nanocompósitos por microscopia eletrônica de varredura

Na Figura 48 são mostradas as imagens de MEV para as amostras de nanocompósitos de poliuretana com nanopartículas de hidroxiapatita. Foram estudadas três concentrações de nanopartículas de hidroxiapatita, 1%; 5%; 10%. As imagens de MEV demonstraram que as três amostras dos nanocompósitos de poliuretana com nanopartículas de hidroxiapatita possuem diferenças na

morfologia. A amostra que apresentou uma maior regularidade na forma das células foi à amostra sintetizada com 5% de nanopartículas de hidroxiapatita. Nas três amostras foram observados alguns poros fechados, mais acentuados e irregulares na amostra sintetizada com 1% de nanopartículas de hidroxiapatita. Estas cavidades fechadas são formadas quando as bolhas de gás não estouram no final da expansão do polímero, resultando em baixa elasticidade, além de possibilidade de encolhimento (VILAR, 2002).

O aparecimento de microcélulas fechadas pode estar relacionado com a baixa velocidade de agitação, ocasionando pouca nucleação, e resultando em estrutura celular grosseira, com paredes espessas e difíceis de serem rompidas; e a temperatura elevada acarretando maior aumento da velocidade de polimerização em relação à expansão (MERLINI, 2011). Pode-se observar também nas amostras com grande teor de nanopartículas (amostra 5% e 10%) aglomerados de nanopartículas, principalmente na amostra contendo 10% onde, em toda a superfície analisada, observa-se aglomerados de nanopartículas, tanto nas paredes como nas cavidades. O aumento gradativo da carga evidenciou maior deformação das células durante fratura do compósito. Silva (2014) em seu trabalho estudou compósitos de poliuretana à base de óleo de milho com carga de 4% de sílica e observou sílica incrustada na face externa da parede da célula e também evidenciou deformação das células com o aumento de carga na matriz polimérica.

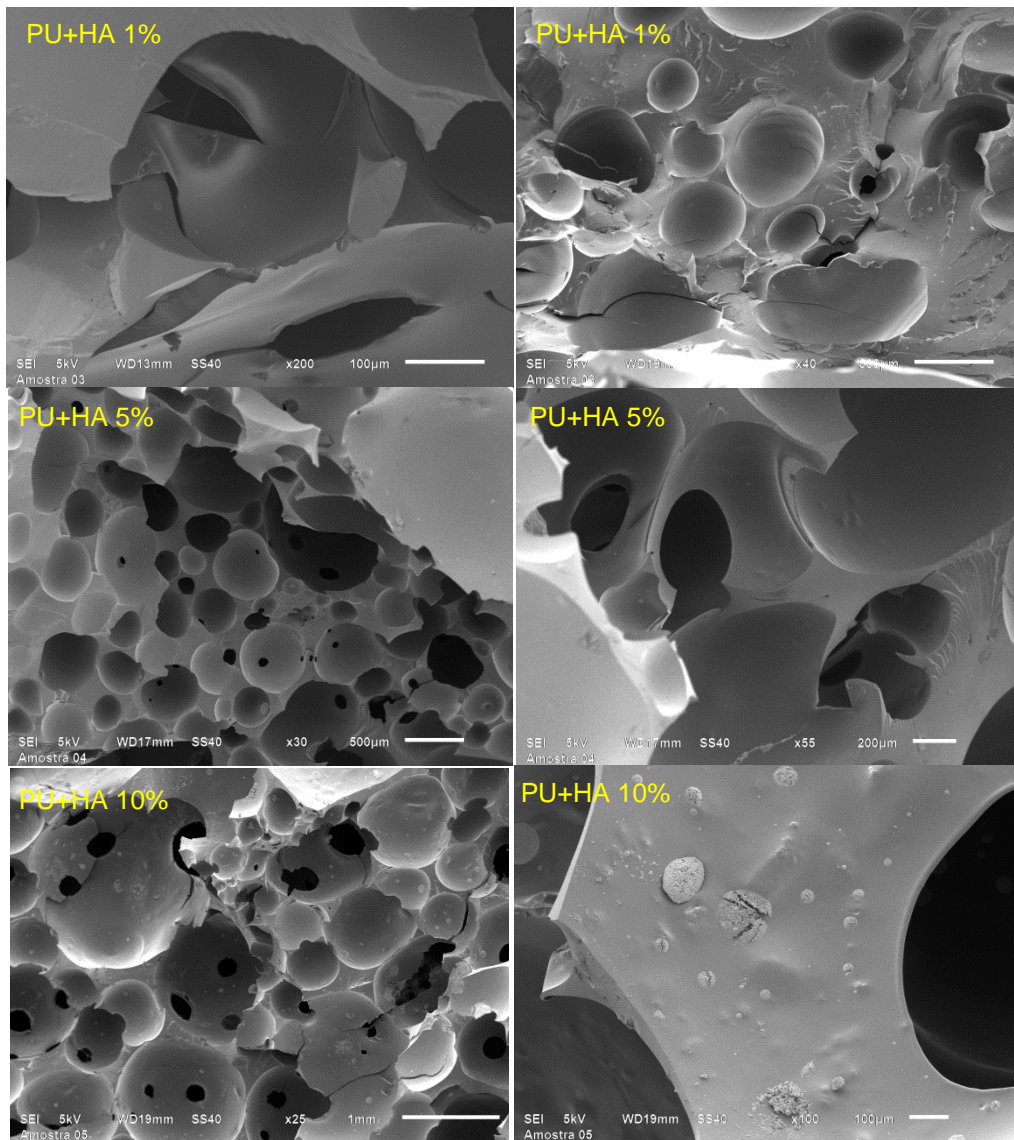


Figura 48. Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos nanocompósitos de poliuretano sintetizados com nanopartículas de hidroxiapatita.

Na Figura 49 são mostradas as imagens de MEV para as amostras de nanocompósitos de poliuretano com 0,5% nanocelulose. Essa imagens mostram regularidade na amostra com poros grandes abertos e fechados. Não foi observado grandes aglomerados de nanopartículas, tanto nas paredes como nas cavidades.

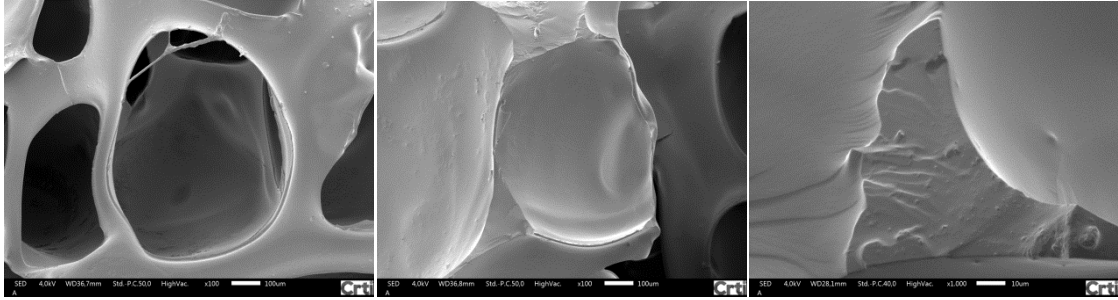


Figura 49. Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos nanocompósitos de poliuretana sintetizados com 0,5% nanocelulose.

Finalmente pensando em atrelar as vantagens de dois tipos de nanopartículas sintetizou-se nanocompósitos de poliuretanas com as duas nanopartículas, hidroxiapatita e nanocelulose, mostrados nas Figuras 50 e 51. As imagens de MEV para as amostras de nanocompósitos de poliuretana com 0,5% nanocelulose mais 0,5% de hidroxiapatita apresentaram regularidade na forma das células e formato celular isotrópico (esférico), parecidos com as amostras contendo apenas hidroxiapatita. Mostrou também microporos dentro da cavidade dos poros maiores. Também não foi observado grandes aglomerados de nanopartículas, tanto nas paredes como nas cavidades devido às pequenas cargas utilizadas.

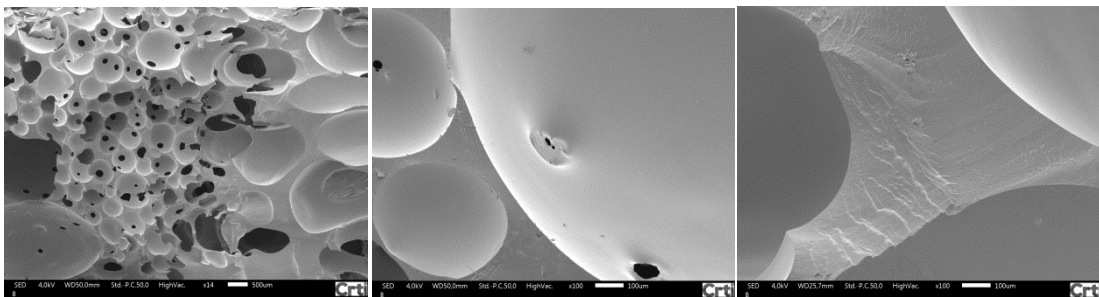


Figura 50. Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos nanocompósitos de poliuretana sintetizados com 0,5% nanopartículas de hidroxiapatita e 0,5% nanocelulose.

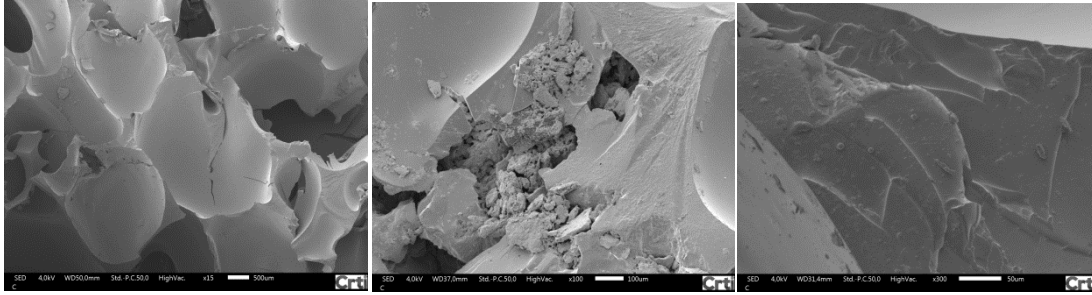


Figura 51. Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos nanocompósitos de poliuretana sintetizados com 1% nanopartículas de hidroxiapatita e 0,5% nanocelulose.

Nas amostras com formulações contendo nanopartículas de hidroxiapatita foram observadas células com formatos esferoidais com microcélulas, parecidas com as observadas por Pacheco e colaboradores (2007), onde realizaram experimentos para a síntese de elastômeros microcelulares de poliuretano para aplicação como batente absorvedor de impacto a partir de polióis poliésteres e MDI, e verificaram a existência de numerosas microcélulas, também observaram que as microcélulas formadas são relativamente esferoidais, não apresentando um determinado sentido de orientação, e atribuíram ao método de expansão adotado (expansão em molde fechado) verificaram também a predominância de microcélulas fechadas. Na Figura 52 são mostrados os histogramas gerados das imagens de MEV dos nanocompósitos.

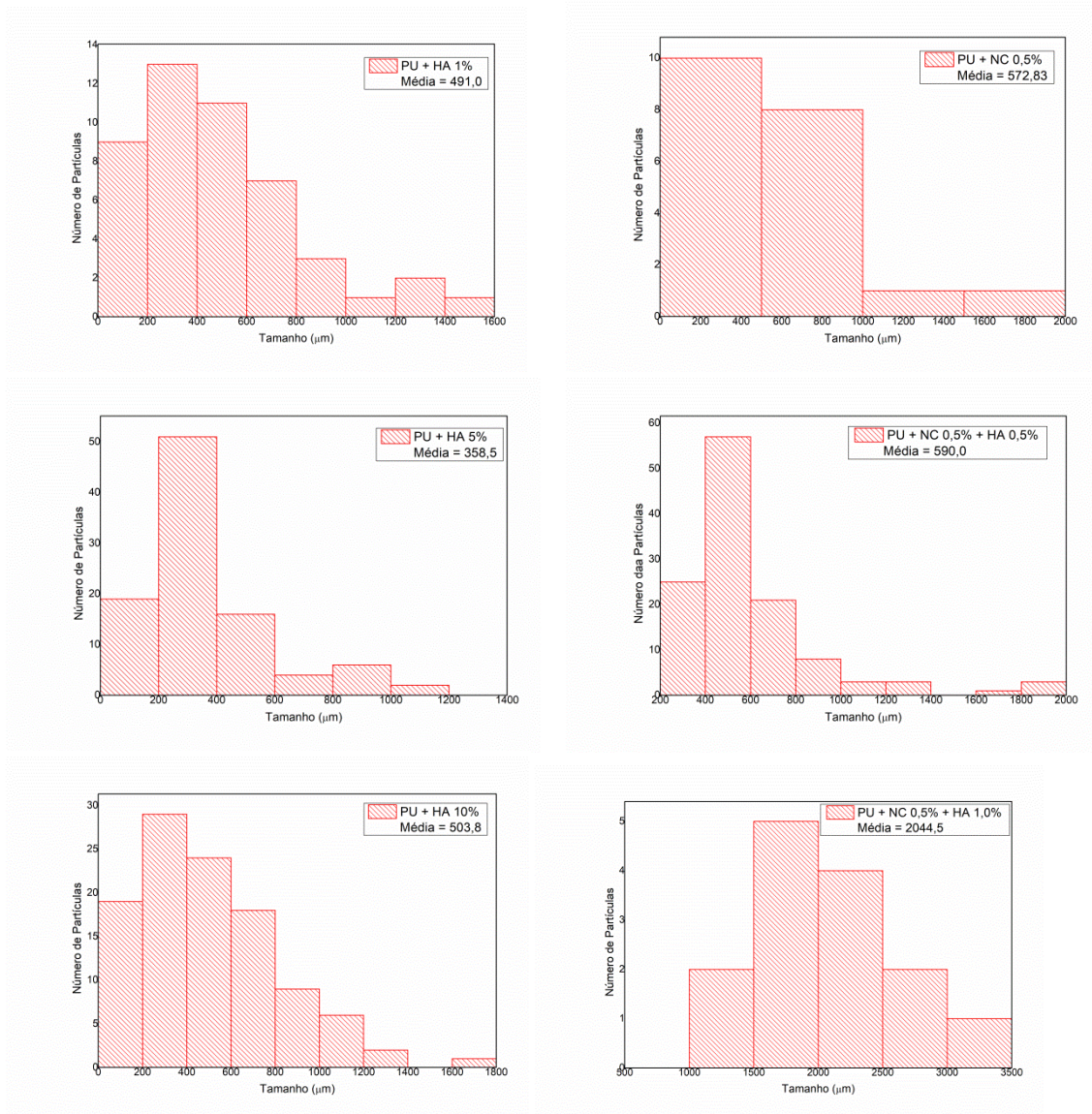


Figura 52. Histogramas do tamanho das células observados nos nanocompósitos.

5.3- Ensaios de viabilidade celular

Os valores de absorvância de poços contendo células incubadas com PU pura foram utilizados como viabilidade a 100% com a finalidade de analisar o efeito da presença de nanopartículas de HA na proliferação celular. Assim, os valores de absorvância dos poços com células incubadas com amostras foram divididos pela absorvância média de poços incubados com PU puro e multiplicado por 100 (equação 6).

$$\text{Viabilidade Amostra (\%)} = \frac{\text{Abs Amostra}}{\text{Media Abs PU}} \times 100 \quad (6)$$

O efeito da presença de nanopartículas de HA em PU na proliferação de células de fibroblastos foi avaliado em função do tempo, por meio do teste metabólico de MTT. A Figura 53 mostra os valores médios de viabilidade obtidos após 24h de cultivo de células, em termos de crescimento celular, em amostras de PU pura e para os nanocompósitos com 1% e 5% de nanopartículas de HA. Os valores calculados pela equação 6 foram utilizados na viabilidade média e no cálculo do desvio padrão que são mostrados na Figura 52.

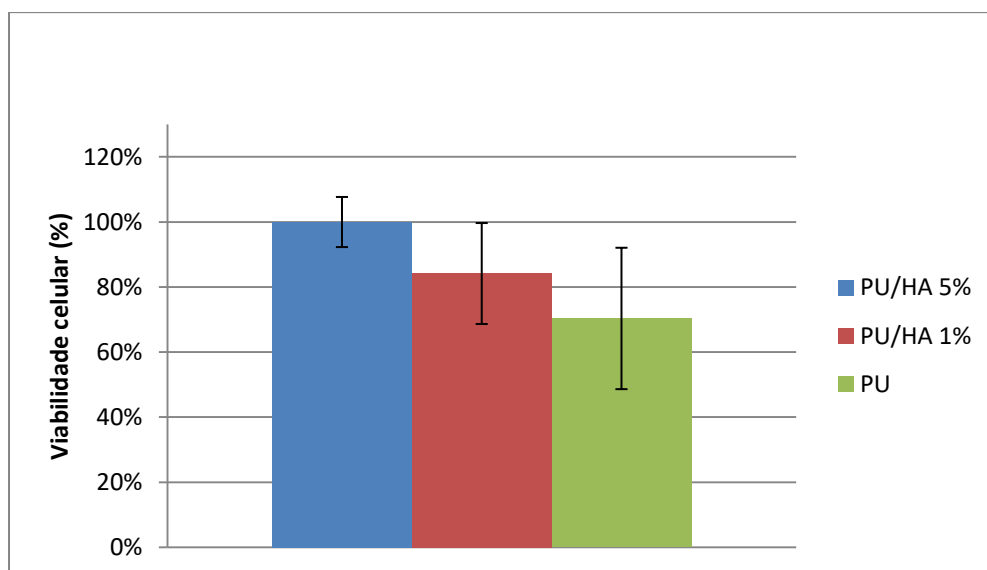


Figura 53. Viabilidade celular de células MEF cultivadas sobre amostras de PU pura e modificada com nanopartículas de HA em diferentes concentrações. Resultados expressos como % da viabilidade celular.

Observou-se que as células de MEF (fibroblasto embrionário de murinos) cultivadas em filmes de PU exibem boa aderência e taxa de multiplicação em todas as amostras estudadas. No entanto, durante o período

de 24 h, o crescimento celular foi maior para amostras de nanocompósitos PU/HA com a maior quantidade de nanopartículas de HA.

A maior viabilidade celular dos nanocompósitos PU/HA, que a observada na PU pura, é um indicativo de que a presença de nanopartículas HA aumenta a proliferação celular. Deve-se enfatizar que a proliferação celular pode ser medida uma vez que o número de células incubadas estava sob o valor de confluência (tipicamente usado em testes de citotoxicidade) e, portanto, a viabilidade celular medida após o período estudado permitiram avaliar a capacidade de proliferação das células para cada tipo de amostra.

O aumento da proliferação celular em amostras contendo nanopartículas pode ser o resultado da maior área de contato entre a superfície e as células devido à morfologia da superfície e conseqüentemente conduziu a uma maior área de proliferação celular e adesão ao material. Acredita-se que esse aumento na viabilidade celular dos nanocompósitos se deve as modificações físico-químicas no polímero devido à inserção das nanopartículas, as quais modificaram a hidrofiliabilidade da PU (Ha, 2005).

Substratos mais hidrofílicos tendem a suportar uma melhor interação com a célula, assim, depois de aderidas, as células iniciam seu processo de espalhamento, divisão e produção de matriz extracelular nova (Langer, 2004). A mudança dos níveis graduais na superfície dos polímeros de PU forneceu indicações úteis em relação às estratégias de preparação de superfície para aplicação na engenharia de tecidos.

6- Conclusão Parcial

Foram sintetizadas poliuretanas derivadas do óleo de mamona, como polioliol e TDI como fonte de isocianatos, sem a adição de catalisador e usando apenas água como agente reticulante e de expansão.

Os dados de infravermelho da amostra de PU demonstra polimerização completa dos precursores de poliuretana. O uso de nanopartículas de hidroxiapatita nos nanocompósitos de PU demonstrou melhorar as

propriedades térmicas do polímero aumentando sua estabilidade térmica e também a suas Tg. Também se observou a partir das imagens de MEV, que a presença das nanopartículas de HA ocasiona uma diminuição no tamanho dos poros da PU em função do aumento no teor de HA. Já o uso de nanocelulose não afetou efetivamente a estabilidade térmica do polímero. A presença da nanocelulose provocou em efeito oposto ao das nanopartículas de HA, em que se verifica um aumento no tamanho dos poros da PU em função do aumento no teor de nanocelulose. Além disso, observou-se também nas microscopias dos nanocompósitos mostraram que a elevada quantidade de nanopartículas dificultou a dispersão das nanopartículas e conseqüentemente afetaram suas propriedades. Já a inserção simultânea das nanopartículas de Hidroxiapatita e nanocelulose apresentaram um efeito sinérgico entre as nanopartículas em todas as propriedades estudadas, como tamanho das células e a Tg, que apresentaram propriedades parecidas com os nanocompósitos com maior número de carga de hidroxiapatita, 5 e 10%.

Por fim, os ensaios de viabilidade celular mostraram que tanto a PU pura quanto os nanocompósitos conte HA não foram citotóxicos e propiciaram o crescimento e proliferação celular. Foi observado que o aumento na quantidade de nanopartículas de hidroxiapatita aumentaram a proliferação celular, demonstrando que esses nanocompósitos apresentam potencialidade para serem utilizados como biomaterial.

7- Referências

Alexandre, M.; Dubois, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. **Materials Science and Engineering**, v.28, p. 1-63, 2000.

Almeida E. F.; Assis, C.; M.; Vercik, L. O.; Guastaldi, A. C. Biomateriais: deposição de hidroxiapatita sobre superfície de Ti-cp modificada por aspersão térmica. **Química Nova**, v. 30, p. 1229-1232, 2007.

Alzari, V.; Nuvoli, D.; Scognamillo, S.; Piccinini, M.; Gioffredi, E.; Malucelli, G.; Marceddu, S.; Sechi M.; Sanna V.; Mariani A.. Graphene-containing thermoresponsive nanocomposite hydrogels of poly(**N**-isopropylacrylamide)

prepared by frontal polymerization. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, p. 8727-8733, 2011.

Baughman, R. H.; Conducting polymer artificial muscles. **Synthetic Metals**, v. 78, p. 339-353, 1996.

Beija, M.; Marty, J. D.; Destarac M. Thermoresponsive poly(*N*-vinyl caprolactam)-coated gold nanoparticles: sharp reversible response and easy tunability. **Chemical Communications**, v. 47, p. 2826-2828, 2011.

Cangemi, J. M.; Santos, A. M.; Neto, S. C. Poliuretano: De Travesseiros a Preservativos, um Polímero Versátil, Rev. **Química Nova na Escola**, vol.31, n., p.159-164, 2009.

Cangemi, J. M.; Claro Neto S.; Chierice G. O.; Santos A. M. Study of the biodegradation of polymer derived from castor oil by electron microscopy, thermogravimetry and infrared spectroscopy. **Polímeros – Ciência e Tecnologia**, Brasil, vol.16, n.2, 129- 135, 2006.

Cangemi, J.M.; Santos, A.M.; Claro Neto, S. E Chierice, G.O. Biodegradation of Polyurethane Derived from Castor Oil. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol.18, n.3, p.201-206, 2008.

Choi, D.; Marra, K. G; Kumta, P. N. Chemical synthesis of hydroxyapatite/poly (ε-caprolactone) composites. **Materials Research Bulletin**, v. 39, p. 417-432, 2004.

Dewez, J. L.; Lhoest, J. B.; Detrait, E.; Berger, V.; Dupont-Gillain, C.C.; Vincent, L. M.; Schneider, Y. J.; Bertrand, P.; Rouxhet, P.G. Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces: from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns. **Biomaterials**, v. 19, p. 1441-1445, 1998.

Esteves, A. C. C; Timmons, A B; Trindade, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**, v. 27, p. 798-806, 2004.

Feng, Q. L.; Cui, F. Z.; Wang, H.; Kim, T. N.; Kim, J. O. Influence of solution conditions on deposition of calcium phosphate on titanium by NaOH-treatment. **Journal of Crystal Growth**, v. 210, p. 735-740, 2000.

Grandfield, K.; Gustafsson, S.; Palmquist, A. Where bone meets implant: the characterization of nano-osseointegration. **Nanoscale**, v. 5, p. 4302-43308, 2013.

Griffith, L. G. Polymeric biomaterials. **Acta Materialia**, v. 48, p. 263-277, 2000.

Griffith, L. G.; Naughton, G. Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities. **Science**, v. 295, p. 1009-1014, 2002.

Ha, G.; Yang, W.; Roh, H.; Lee, I.; Koo, J.; Hwan, G., Plasma surface modification of poly (d ,l-lactic-co-glycolic acid) (65/35) film for tissue engineering. **Surface and Coatings Technology**, v. 193, p. 60-69, 2005.

Ignácio, H; Mazzer, N; Barbieri, C.H; Chierice, G.O. Estudo sobre a aplicabilidade médica da poliuretana derivada de óleo de mamona. **Resenha Ortopédica, Órgão oficial da área de ortopedia e traumatologia da faculdade de medicina de Ribeirão Preto**. São Paulo. V.2, n.6, p. 10-12, 1996.

Jain, J. P.; Sokolsky, M.; Kumar, N.; Domb, A. J. Fatty Acid Based Biodegradable Polymer. **Journal Polymer Reviews**, v. 48, p. 156-191, 2008.

Jiao, L., Xiao, H., Wang, Q. & Sun, J. Thermal degradation characteristics of rigid polyurethane foam and the volatile products analysis with TG-FTIR-MS. **Polym. Degrad. Stab.** v. 98, p. 2687–2696, 2013.

Kaneto, K.; Kaneko, M.; Min, Y.; MacDiarmid, A. G. “Artificial muscle”: Electromechanical actuators using polyaniline films. **Synthetic Metals**, v. 71, p. 2211-2212, 1995.

Kano, M. Y. **Uso do álcool em idosos: validação transcultural do Michigan Alcoholism Screening Test - Geriatric Version (MAST-G)**, Dissertação de Mestrado, USP Ribeirão Preto, 2011.

Kumar, A.; Srivastava, A.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications. *Progress in Polymer Science*, v. 32, p. 1205-1237, 2007.

Liang, L.; Liu, J.; Gong, X. Thermosensitive Poly(N-isopropylacrylamide)–Clay Nanocomposites with Enhanced Temperature Response. **Langmuir**, v. 16, p. 9895–9899, 2000.

Langer, R.; Tirrell, D. A. Designing materials for biology and medicine. **Nature**, v. 428, p. 487-492, 2004.

Lin, N.; Huang, J.; Chang, P. R.; Feng, L.; Yu, J. Effect of polysaccharide nanocrystals on structure, properties, and drug release kinetics of alginate-based microspheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 270-279, 2011.

Liu, T. Y.; Hu, S. H.; Liu, K. H.; Liu, D. M.; Chen, S. Y. Study on controlled drug permeation of magnetic-sensitive ferrogels: Effect of Fe₃O₄ and PVA. **Journal of Controlled Release**, v. 126, p. 228-236, 2008.

Liu, T. Y.; Hu, S. H.; Liu, D. M.; Chen, S. Y.; Chen, W. I. Biomedical nanoparticle carriers with combined thermal and magnetic responses. **Nano Today**, v. 4, p. 52-65, 2009.

Loizou, E.; Butler, P.; Porcar, L.; Kesselman, E.; Talmon, Y.; Dundigalla, A.; Schmidt, G. Large Scale Structures in Nanocomposite Hydrogels. **Macromolecules**, v. 38, p. 2047-2049, 2005.

Loos, W.; Verbrugghe, S.; Goethals, E. J.; Du Prez, F. E.; Bakeeva, I. V.; Zubov, V. P. Thermo-Responsive Organic/Inorganic Hybrid Hydrogels based on Poly(N-vinylcaprolactam). **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 204, p. 98-103, 2003.

Lysaght, M. J.; Hazlehurst, A. L. Tissue Engineering: The End of the Beginning. **Tissue Engineering**, v. 10, p. 309-320, 2004.

Makhaeva, E. E.; Tenhu, H.; Khokhlov, A. R. Behavior of Poly(N-vinylcaprolactam-co-methacrylic acid) Macromolecules in Aqueous Solution: Interplay between Coulombic and Hydrophobic Interaction. **Macromolecules**, v. 35, p. 1870-1876, 2003.

Mano, E.; Mendes, C. **Introdução a Polímeros**. Edgard Bucher LTDA, 2004, 191f.

Merlini, C. **Análise experimental de compósitos de poliuretano derivado de óleo de mamona e fibras de bananeira**. Dissertação – UFSC. Florianópolis-SC, 2011.

Mazur, R. L., Botelho, E. C., Costa, M. L.; Rezende, M. C. Avaliações térmica e reológica da matriz termoplástica PEKK utilizada em compósitos aeronáuticos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, p. 237-243, 2008.

Nam, P. H.; Maiti, P.; Okamoto, M.; Usuki, T.; Hasegawa, N.; Usuki, A. A hierarchical structure and properties of intercalated polypropylene/clay nanocomposites. **Polymer**, v. 42, p. 9633-9640, 2001.

Nitz, H.; Semke, H.; Landers, R.; Mulhaupt, R. Reactive extrusion of polycaprolactone compounds containing wood flour and lignin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 81, p. 1972-1984, 2001.

Paul, D.R.; Robeson, L.M. Polymer nanotechnology: Nanocomposites. **Polymer**, v. 49, p. 3187-3204, 2008.

Pei, A.; Malho, J. M.; Ruokolainen, J.; Zhou, Q.; Berglund, L. A. Strong Nanocomposite Reinforcement Effects in Polyurethane Elastomer with Low Volume Fraction of Cellulose Nanocrystals. **Macromolecules**, v. 44, p. 4422–4427, 2011.

Petzhold, C. L.; Menger, R. K.; Veronese, V. B. **Processo de produção de polióis a partir de glicerina loira**. BR n PI0901857-3 A2, 27 mai. 2009, 25 jan. 2011.

Pich, A.; Boyko, V.; Lu, Y.; Richter, S.; Adler, H.J.; Arndt, K.-F. Preparation of PEGMA-functionalized latex particles. 2. System styrene/N-vinylcaprolactam. **Colloid and Polymer Science**, v. 281, p. 916-920, 2003.

Pompe, G.; Pohlers, A.; Pötsche, P.; Piontek, J. Influence of processing conditions on the multiphase structure of segmented polyurethane. **Polymer**, v. 39, p. 5147-5153, 1998.

Roy, R.; Komarneni, S.; Roy, D. M. Multi-Phasic Ceramic Composites made by Sol-Gel Technique. **Materials Research Society Symposium Proc.**, 1984, v. 32, p. 347-359, 1984.

Sanna R, Sanna D, Alzari V, Nuvoli D, Scognamillo S, Piccinini, M, Lazzari M, Gioffredi E, Malucelli G, Mariani, A. Synthesis and characterization of graphene-containing thermoresponsive nanocomposite hydrogels of poly(N-vinylcaprolactam) prepared by frontal polymerization. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 50, p. 4110-4118, 2012.

Sanna R.; Fortunati E.; Alzari V.; Nuvoli D.; Terenzi A.; Casula M. F.; Kenny J. M.; Mariani A. Poly(N-vinylcaprolactam) nanocomposites containing nanocrystalline cellulose: a green approach to thermoresponsive hydrogels. **Cellulose**, v. 20, p. 2393-2402, 2013.

Schubert, U.; Husing, N.; Lorenz, A. Hybrid inorganic-organic materials by sol gel processing of organofunctional metal alkoxides. **Chemistry of Materials**, v. 7, 2010- 2027, 1995.

Schmaljohann, D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1655-1670, 2006.

Serves, V. **Espumas flexíveis de poliuretana à base de polióis de óleo de mamona etoxilado**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2007, 89f.

Shin, H.; Jo, S.; Mikos, A. G. Biomimetic materials for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, p. 4353-4364, 2003.

Silva, S. A. **Síntese e caracterização de poliuretanos : espumas flexíveis puras e compósitos a partir de polióis à base de óleo de milho : e adesivos à base de derivados de óleo de rícino**. Universidade federal do paraná– Curitiba, 2014. 207 f.

Silva, V. R. **Espumas Rígidas de Poliuretano Baseadas em Óleos Vegetais Utilizando Rejeitos Industriais Inorgânicos como Carga e Retardante de Chamas**. Tese (doutorado em ciências-química). UFMG, Belo Horizonte-MG 2013.

Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: Guadanabara, 1994, 387 p.

Soares, M. S. **Síntese e caracterização de espumas de poliuretano para imobilização de células íntegras e aplicação na síntese de biodiesel.** Universidade de São Paulo. Lorena, 2012.

Somani, K. P., Sujata S. Kansara, Patel, N. K., Rakshit, A. K. Castor oil based polyurethane adhesives for wood-wood bonding. **International Journal of Adhesion & Adhesives**, 23, 269-75, 2003.

Somorjai, G. A.; Frei, H.; Park, Jeong Y. Advancing the Frontiers in Nanocatalysis, Biointerfaces, and Renewable Energy Conversion by Innovations of Surface Techniques. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, p. 16589-16605, 2009.

Souza, D. R. S. Preparação e caracterização de poliuretano à base de poli(ϵ -caprolactona) reforçado com nanocristais de celulose. universidade federal de minas gerais, Belo Horizonte, 2013. 93f.

Storz, O.; Gasthuber, H.; Woydt, M. Tribological properties of thermal-sprayed Magnéli-type coatings with different stoichiometries (Ti_nO_{2n-1}). **Surface and Coatings Technology**, v. 140, p. 76-81, 2001.

Suleman, S.; Khan, S. M.; Jamil, T.; Aleem, W.; Shafiq, M.; Gull, N. Synthesis and Characterization of Flexible and Rigid Polyurethane Foam. **Asian Journal of Applied Sciences**, v. 02 (05), p. 701-710, 2014.

Trovati, G.; Sanches, E. A.; Neto, S. C.; Mascarenhas, Y. P.; Chierice, G. O. J. Characterization of polyurethane resins by FTIR, TGA, and XRD. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 115, p. 263-268, 2010.

Vilar, W. **Química e Tecnologia dos Poliuretanos.** Vilar consultoria; 3° Ed.; Rio de Janeiro, 2002.

Yamaki, S. B., Pedroso, A. G., Atvars, T. D. Z. O estado vítreo dentro da perspectiva do curso de graduação em química (Físico-química). **Química Nova**, v. 25, p. 330-334, 2002.

Yeganeh, H.; Lakouraj, M.M.; Jamshidi, S. Synthesis and properties of biodegradable elastomeric epoxy modified polyurethanes based on poly (ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol). **European Polymer Journal**, v. 41, p. 2370-2379, 2005.

Wan, Y.; Wen, D. Preparation and characterization of porous conducting poly(dl-lactide) composite membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 246, p. 193-201, 2005.

Wang, K. H; Choi, M. H.; Koo, M. C.; Choi, Y. S.; Chung, I. J.; Synthesis and characterization of maleated polyethylene/clay nanocomposites. **Polymer**, v. 42, p. 9819-9826, 2001.

Wiebeck, H.; Harada, J. **Plásticos de engenharia**. Artiber editora, São Paulo, **2005**.

Winey, K. I.; Vaia, R. A.; Polymer Nanocomposites. **MRS Bulletin**, v. 32, p. 314-322, 2007.

ZHANG, Y.; HOURSTON, D. J. Rigid interpenetrating polymer network foams prepared from a rosin-based polyurethane and an epoxy resin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 69, p. 271-281, 1998.

Considerações Finais

Durante esta tese foram obtidos nanocompósitos biocompatíveis de poliuretana com nanopartículas de celulose e hidroxiapatita. Buscando avaliar a utilização das nanopartículas nas propriedades termo-mecânicas dos nanocompósitos.

Na parte A foi mostrados que a fibra do bagaço de cana-de-açúcar pode ser utilizado como uma fonte de matéria prima para a produção de nanoceluloses. O pré-tratamento químico realizado removeram os componentes não celulósicos, resultando em fibras com um baixo teor de lignina e um elevado teor de celulose, os quais foram adequados para a extração do nanocristais de celulose.

Na parte B nanopartículas de HA foram sintetizadas com sucesso pelo método hidrotérmico. A otimização de síntese foi realizada usando um planejamento fatorial onde foi possível controlar a forma e o tamanho das nanopartículas. Os resultados demonstram a possibilidade de maximizar o controle de síntese das nanopartículas de HA usando um planejamento fatorial, um método simples, mas não simplista.

Por fim, parte C, foram inseridas nanopartículas de celulose e/ou hidroxiapatita na matriz polimérica de poliuretana. Obtendo assim de nanocompósitos de poliuretanas preparadas com óleo de mamona reforçadas com nanopartículas. Foi observada a polimerização completa dos precursores de poliuretana. O uso de nanopartículas de hidroxiapatita nos nanocompósitos demonstrou melhorar as propriedades térmicas e ocasiona também uma diminuição no tamanho dos poros dos nanocompósitos em função do aumento no teor de hidroxiapatita. Já o uso de nanocelulose não afetou efetivamente a estabilidade térmica do polímero e ocasiona um aumento no tamanho dos poros dos nanocompósitos em função do aumento no teor de nanocelulose. Já a inserção simultânea das nanopartículas apresentou um efeito positivo nas propriedades térmicas do nanocompósito em relação ao uso apenas de nanocelulose. Também foram realizados ensaios de viabilidade celular nos nanocompósitos de poliuretana com hidroxiapatita, onde foi observado que o

aumento na quantidade de nanopartículas aumenta a proliferação celular, demonstrando que esses nanocompósitos apresentam potencialidade para serem utilizados como biomaterial.

Synthesis and Optimization of Colloidal Hydroxyapatite Nanoparticles by Hydrothermal Processes

Thaís M. Arantes,^a Lílian M. M. Coimbra,^b Fernando H. Cristovan,^c Tatiane M. Arantes,^c Gabriel M. Rosa^a and Luciano M. Lião^{*,a}

^aInstituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 74690-900 Goiânia-GO, Brazil

^bInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Avenida Oeste, 350, Parque União, 76200-000 Iporá-GO, Brazil

^cDepartamento de Química, Universidade Federal de Jataí, Campus Jatobá, BR 364, km 195, No. 3800, 75801-615 Jataí-GO, Brazil

This paper reports an optimized, simple, fast and inexpensive method for hydroxyapatite (HA) nanoparticle synthesis. Through a multivariate statistical analysis using a factorial design with 2³ resolution, an empirical model was developed which allows control of the shape and size of the HA nanoparticles. This model was used to synthesize HA nanoparticles with sizes between 8 and 600 nm, formed by oriented attachment growth mechanism. The structure was confirmed by transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) images, which also showed that HA nanoparticles had well-defined nanorod forms and narrow size distributions. It was observed that the model is statistically significant and the main parameter for the growth of crystals in the hydrothermal process was temperature.

Keywords: hydroxyapatite, factorial design, hydrothermal, colloids, biomaterials

Introduction

The application of biomaterials in bone tissue repair has revolutionized orthopedic and dental treatments; the need for further research in the field of implants aiming to discover new applications such as biocompatible materials in many organic systems is evident. To be a viable alternative material to bone, it should be biocompatible, possess a biofunctional resistance and have the necessary mechanical and chemical properties to support the loads imposed.¹⁻³ The search for materials with human biocompatibility properties constitutes a major challenge for researchers in the field of new materials. Biomimetism and bioinspiration have been used for the synthesis and development of innovative materials and devices for various biomedical applications. Biomimicry for the synthesis of biomaterials can be performed at distinct levels according to the composition, structure, morphology and physico-chemical properties of the synthetic material.^{4,5}

Among the biomaterials, hydroxyapatite (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, HA) has been studied and applied in

several biomedical research fields, due to its similarity with the mineral constituents of human bones and teeth.⁶ Synthetic HA nanoparticles exhibit good biocompatibility, bioactivity and osteoinducibility.^{1-3,6-8} Due to its unique quantum confining effects and the reactivity of the surface area, nanocrystalline HA exhibits better bioactivity, biocompatibility and improved mechanical properties than microcrystalline and bulk HA.⁹ HA is the major mineral component of bone and teeth structures, corresponding to about 30-70% of the mass of bones and teeth.³ Synthetic HA has been extensively studied and used as it presents biocompatibility with bone minerals and does not present distinct phases of other calcium phosphates (Ca-P) when carefully synthesized.^{7,8} However, implants made with pure HA exhibit low tensile strength, impact and fatigue resistance.^{10,11} Recent research focuses on overcoming limitations of calcium phosphates and HA ceramics such as low bioresorbability, low surface area and low bioreactivity, and the improvement of their biological properties.^{4,5}

The major mineral makeup of bone are homogeneous plate-like HA crystals with lengths of 15-30 nm and diameters of 30-50 nm, and enamel and dentin are bead-shaped HA crystals with diameters of 25-100 nm and lengths

*e-mail: lucianoliao@ufg.br

of 100 nm to microns. The study of biomineralization and biomimetic assembly involves the search for an advanced method so that the synthesis of HA nanocrystals can be controlled with precision.^{4,12,13} With nanotechnology, it is possible to synthesize inorganic crystals with nanometric dimensions, characterized by high surface area, shape control and structural organization that increases crystalline bioreactivity. For the optimization of the biomedical applications of biomimetic HA, its chemical and physical characteristics such as size, porosity, morphology and surface properties must be adapted according to the application.⁴ Although each of the approaches reported to produce nanometric HA crystals has both scientific and practical relevance, very little attention has been paid to the physical and chemical details involved in controlling the size and shape distribution of particles. Indeed, in the case of particle size distribution, most of the reported synthetic routes produce a mixture of particles with a wide size distribution of tens to hundreds of nanometers, and many do not show shape control.^{14,15}

Furthermore, bone is a complex composite of a biopolymer, mostly collagen (type I), and biomineral in a mineralized matrix.¹³ Thus, in this work, the objective was to synthesize homogeneous stable colloidal dispersions of HA nanoparticles with shape and size control to be used as reinforcing agents in biocompatible polymers, which will be used as biomaterials in medical/dental applications.

With respect to synthesis strategies to obtain colloidal nanoparticles of HA, there are various methods such as hydrothermal,¹⁶⁻¹⁹ chemical precipitate,^{20,21} wet chemical,^{22,23} and sol-gel²⁴ methods. Among these, the hydrothermal method has aroused great interest due to its good repeatability, wide temperature range, the possibility to control the form, size, and shape, simplicity of operation, ability to produce crystalline nanoparticles without posterior thermal treatment,²⁵ and especially to obtain stable colloidal suspensions of nanoparticles. Another advantage of hydrothermal synthesis is that it does not require the final calcination step to obtain a pure crystalline material.^{26,27} The applications of HA nanoparticles are influenced by the shape, crystallinity and purity of the synthesized material. Therefore, it is important to control the shape, size and crystalline structure of the nanoparticles according to the different synthesis conditions. However, to the best of our knowledge, most studies aiming to obtain HA nanoparticles with varied shapes and sizes use a univariate approach. In this case, all variables are kept at a constant level and only one variable is changed to maximize the property studied.²⁸ This process is repeated to evaluate the optimal value for each variable of the system. The univariate method does not consider interactions between variables. Thus, the best

value of a variable can lead to an incorrect interpretation of the results. To solve this problem, the multivariate approach should be used, changing all variables at the same time.^{29,30} The multivariable approach is a powerful tool to measure and understand the effects of specific independent variables, as it is possible to estimate interactions between the variables on the experimental response, with a small number of experiments. Furthermore, it allows the prediction of system properties in non-performed experiments.

In this study, low cost and environmentally compatible reagents for the synthesis of pure HA nanoparticles were used. In addition, the synthesized nanoparticles presented high crystallinity, great homogeneity in relation to size and shape without the need for subsequent sizing, and it is still possible to select them. A soft temperature range between 100-140 °C, reaction times of 24-48 h, calcium chloride as calcium source and ammonium hydroxide for pH control were also applied. In all experiments the pH was maintained at 9.0. More drastic conditions were employed in Sadat-Shojai *et al.*¹⁹ synthesis, such as reaction time of 60 h, 200 °C in the experiment of higher level, pH variation and additives like urea. In this work an empirical model that allows the control of the shape and size of HA nanoparticles due to the control of the initial experimental conditions was proposed. Although studies using factorial design to understand the effect of some experimental conditions on the final properties of colloidal HA nanoparticles have been previously published,^{19,21,22,24,25,28,29,31} only a few of them evaluated the statistical significance of the effects. Usually, these studies present models that consider the experimental parameters that affect the size of the particles, which were previously identified in univariate studies, but their statistical significance has been ignored, which is not true in multivariate studies. Therefore, this study aims to present an effective way to predict the final particle size of colloidal HA nanoparticles.

Experimental

HA nanoparticles were synthesized by hydrothermal process. A solution of calcium chloride (Aldrich, 93%) was added to a 100 mL autoclave bottle, and added dropwise into an ammonium phosphate (Aldrich, 98%) aqueous solution. The molar ratio (Ca/P) was kept constant according to its stoichiometric ratio in HA (1.67). The mixture pH was adjusted to 9.0 using ammonia aqueous solution (Aldrich, 28-30%), and heated at different times. After the synthesis time, the reaction system was allowed to cool to room temperature; subsequently, the samples were dried on a Petri dish at 50 °C. The synthesis optimization

was performed by two-level, three-factor factorial design (2^3), requiring eight experiments to evaluate the parameters influencing the size of HA nanoparticles. The three variables tested were synthesis temperature (T), precursor concentrations (C), and reaction time (t). The experimental conditions used were based on the literature.^{17-19,25,27,31,32} All matrix calculi were carried out using the free software GUI Octave³³ (version 3.6), in Microsoft Windows 10 Home 64 bits System.

Two levels, high (+) and low (–), were defined for each factor, as shown in Table 1. The stoichiometric ratio of precursors was kept constant at 1:1, thus, the precursor concentrations used were 0.03 and 0.1 mol L⁻¹. Table 1 describes the eight experiments proposed by the fractional factorial design. These experiments were conducted in a random order.

Table 1. Factorial design 2^3 for the HA nanoparticles synthesis

Variable	Low level (–)	High level (+)						
Temperature / °C	100	140						
time / h	24	48						
Concentration / (mol L ⁻¹)	0.03	0.1						
Response	particle size / nm							
	Experiment No.							
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8

Temperature	–	+	–	+	–	+	–	+
time	–	–	+	+	–	–	+	+
Concentration	–	–	–	–	+	+	+	+

Subsequently, the determination of average particle size for each experimental condition, the main effects, and secondary and tertiary effects (interaction effects) were calculated; significant effects were accounted for in the formulation of the model to describe how the factors and interactions can influence the average particle size. The average nanoparticle sizes were obtained using the free software Image J,³⁴ counting about 200 particles in several images (about 10 images *per* sample) obtained in different regions of the sample. In addition, for each sample, synthesis was performed in duplicates that were later characterized by microscopy and used in the construction of histograms.

To identify crystalline structures, the nanoparticles were qualitatively characterized by X-ray diffraction (XRD), using a Rigaku diffractometer model DMax 2500PC (CuK α radiation) with $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$, operating in the range of 2θ from 10 to 110° with a step of 0.02° and a step time of 1 s. The Raman spectra were obtained using a Bruker RFS100 spectrometer with neodymium-doped

yttrium aluminum garnet (ND-YAG) laser (1064 nm), using a power of 150 mW, and region of $100\text{-}2000 \text{ cm}^{-1}$, with 32 scans and a resolution of 4 cm^{-1} at room temperature. Qualitative evaluation of the chemical composition was obtained using diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) spectroscopy (Bruker Equinox 55). The spectra were recorded in the range $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ at a resolution of 2 cm^{-1} . Transmission electron microscopy (TEM) images were obtained with a JEOL JEM-3010 operating at 300 kV equipped with a GATAN multi-Scan CCD camera model 794. Scanning electron microscopy (SEM) images were recorded with a JEOL JSM-5600LV operated at 20 kV, using secondary electrons to form the image. The SEM samples were coated with a thin layer of gold.

Results and Discussion

HA nanoparticles applications are influenced by morphology and crystallinity.²⁶ In that context, it was very important to establish a clear relationship between experimental conditions and particle morphology and crystallinity. The crystalline structures of the samples synthesized with different experimental conditions are shown in Figure 1. All diffraction peaks of the XRD pattern can be easily indexed to a pure hexagonal phase of HA, which agrees with the reported data (Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) powder diffraction file (PDF) No. 090432).¹⁷ The results corresponded to a crystalline HA phase with a hexagonal unit cell and lattice parameters $a = 9.432 \text{ \AA}$ and $c = 6.881 \text{ \AA}$; no additional peaks were present, especially in the range $27\text{-}31^\circ$. These peaks can be attributed to tetracalcium phosphate (TTCP) phase or tricalcium phosphate (β -TCP) phase which is usually present in the HA nanoparticles.³¹

The crystallite size calculations for the nanoparticles were performed from the Scherrer equation:

$$L = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (1)$$

where L is the crystallite size; K is the proportionality constant (the Scherrer constant, $K = 0.9$); λ is the wavelength of radiation in the X-rays emission CuK α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$); β is the peak width in full width at half maximum (FWHM); and θ is Bragg's diffraction angle.^{35,36}

Table 2 shows crystallite size (L) for different diffraction peaks in each experiment. Crystallite size for all samples except sample E5 showed relatively close sizes with L varying from 12 to 23 nm for most diffraction peaks, only at the peak relative to the plane (002) was

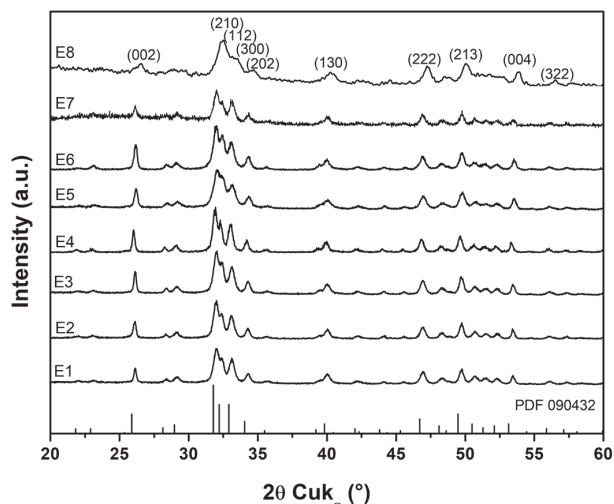


Figure 1. XRD for HA nanoparticles synthesized with different experimental conditions. The individual experimental conditions are shown in Table 1. The Miller index assignment is shown in E8.

observed higher values of L in the range of 28-48 nm. This result indicates that there is a preferential growth of the nanoparticles perpendicular to this plane. Sample E5 showed L around 8 nm for all diffraction peaks indicating that for this synthesis condition the crystallites show no preferential growth in any direction. Dhand *et al.*²³ studied the synthesis of nanocrystals of HA by a wet chemistry method and observed this same preferential growth in the (002) direction in the c -axis with crystallite sizes between $15\text{-}60 \pm 5$ nm, and lengths of approximately 500 nm confirmed by TEM.²³ Sadat-Shojai *et al.*,¹⁹ in hydrothermal synthesis of HA, also observed this same behavior of preferential growth of the nanoparticles and reported that c -axis size increases when the hydrothermal temperature increases, which is accompanied by decrease in growth in the other directions.

Table 2. Crystallite size according to diffraction peaks

Plane	Crystallite size (L) / nm							
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
(002)	48	34	37	41	9	27	34	28
(210)	17	19	17	23	8	19	17	14
(112)	17	18	20	22	9	16	21	15
(300)	16	16	17	17	8	16	16	13
(202)	19	20	23	23	9	20	20	12

The Raman spectroscopy results for HA nanoparticles are shown in Figure 2. The Raman spectra of all samples are similar and demonstrate typical HA vibrations, with the main lines observed in the spectral range $360\text{-}1160$ cm^{-1} . The bands at 431 and 450 cm^{-1} are due to the phosphate

ν_2 vibrations, bands at 585 and 610 cm^{-1} are due to phosphate ν_4 vibrations and the band at 960 cm^{-1} is due to phosphate ν_1 PO_4^{3-} vibrations in HA phase.^{17,31} The Raman modes observed in the range from $1020\text{-}1080$ cm^{-1} can be ascribed to the stretching ν_1 mode of carbonate,^{17,18,20,21} and the bending mode of carbonate at 1045 cm^{-1} ,¹⁷ which overlaps with the wide background of the phosphate ν_3 vibrations.²¹ According to Nosenko *et al.*³¹ the values of the frequencies of PO_4^{3-} in water obtained from Raman scattering measurements are ν_1 at 936 cm^{-1} , ν_2 at 415 cm^{-1} , ν_3 at 1010 cm^{-1} , and ν_4 at 558 cm^{-1} .³⁷ Usually, the band at 945 cm^{-1} is assigned to amorphous calcium phosphate, as can be seen in sample E4,³⁸ which indicates a highly disordered structure, although not necessarily a completely amorphous one, and ν_1 vibration components of PO_4^{3-} of β -TCP.³⁰ According to the Raman spectra, the formation of amorphous calcium phosphate was verified in condition E4, probably due to Ostwald ripening particle coarsening process.^{39,40} This process occurs because in experiment E4 the temperature and reaction time were at the highest (+) level and thus the small particles were subjected to redissolution. When they underwent re-nucleation, they initially formed amorphous calcium phosphate, precursor of HA. The same was not observed in experiment E8, where the concentration was also at the highest level, although there were greater availability of ions in the solution. The reaction time in this case was sufficiently large so that all the amorphous phosphate was converted to HA. However, the presence of β -TCP phase was not observed by XRD. According to Kim *et al.*,⁴¹ the presence of calcium phosphate phases in HA often exhibits a combination of enhanced bioactivity and mechanical stability that is

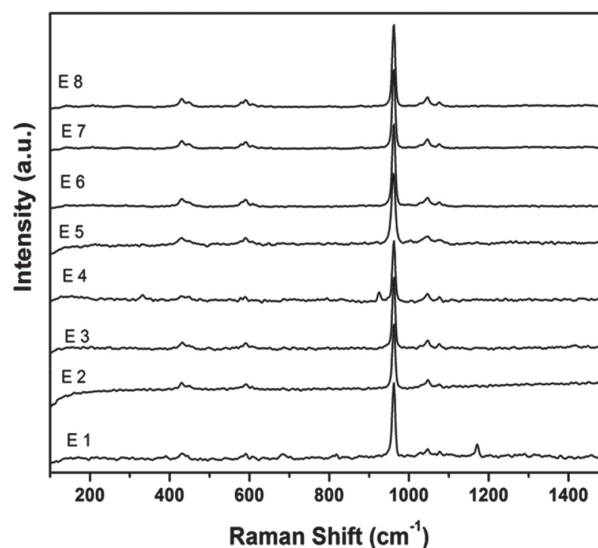


Figure 2. Fourier transform-Raman spectra for HA nanoparticles synthesized according to the factorial design.

difficult to achieve in single-phase materials. This makes these biphasic bioceramics promising substrate materials for applications in bone tissue regeneration and repair.

Figure 3 presents typical Fourier transform infrared (FTIR) spectra for HA nanoparticles.^{24,30} Stretch bands at 1023 and 1088 cm^{-1} , as well as the deformation bands at 503, 561 and 600 cm^{-1} , were observed for the phosphate group (PO_4^{3-}).^{8,42} In addition to the phosphate bands, two bands appeared at 1193 and 868 cm^{-1} , which can be assigned to the OH in-plane bending and P-(OH) stretching modes of HPO_4^{2-} groups in the structure, respectively.³⁰ The presence of base backbone moieties of phosphate and hydroxyl groups along with calcium confirmed the complete synthesis of HA due to the presence of the band at 632 and 3570 cm^{-1} .²³ According to Dhand *et al.*,²³ peaks around 3570 and 632 cm^{-1} were characteristic chemical signatures representing the appropriate stoichiometric ratios for the synthesis of HA nanoparticles.^{23,24,30} Additionally, Wang *et al.*⁴³ attributed the narrow band around 3600 cm^{-1} to O-H stretching in the HA crystalline structure.

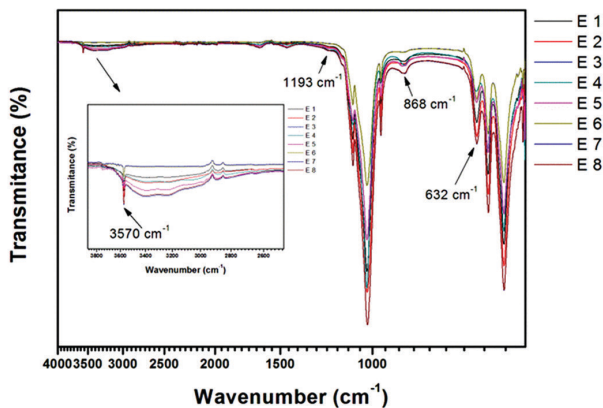


Figure 3. FTIR spectra of HA nanoparticles.

The morphology of all nanoparticle samples is shown in Figure 4. SEM and TEM showed that nanoparticles with rod shapes were obtained for all synthesis conditions. However, at the highest temperature (140 °C, Figure 4, E8), concentration and time of synthesis, these rods were larger and thinner than those obtained by the other conditions. On the other hand, for sample E5, the TEM image showed rod forms with porous structures due to oriented attachment growth mechanism among the nanoparticles with dimensions of around 8 nm. The other experimental conditions showed nanorod structures; their size distributions are shown in Figure 5 and Table 2. Several authors have also reported the targeted growth of the HA nanoparticles along the c-axis in the direction of the crystallographic plane (002) forming rod-shaped nanoparticles. As observed in the present study, HA

nanoparticles also showed growth oriented through the direction-oriented coalescence growth mechanism (002), which can be confirmed both by XRD measurements and by the crystallite size. This coalescence can be clearly verified in the TEM images of the samples of E5, where it is found that the rods are in fact formed by smaller particles which, when joined, grow oriented in a preferred direction.^{4,23,44}

From the 2^3 factorial design, eight experiments were performed, making it possible to calculate the main effects and interaction effects (secondary and tertiary effects); these are displayed in Table 3. Figure 6 presents the Pareto plot for the experimental design, which shows that all effects have a positive value, indicating that the particle size increases with the change of the inferior to the superior level of parameters studied and that all effects are significant. In this case, seven effects have p -values less than 0.05, indicating that they are significantly different from zero at the 95.0% confidence level. The variable that most influenced size was temperature. In experiments 1 and 5, low temperatures and short times were used, and rod-shaped nanoparticles were formed by nanospheres. In experiments using higher temperatures, nucleation in the c-axis was induced, producing nanorods. This was due to the capillary process and the Ostwald ripening process.³⁹ Chen *et al.*⁴⁵ synthesized HA nanoparticles by hydrothermal treatment and observed the self-organization of HA nanorods through the oriented attachment. The nanorods were arranged in order along the c-axis of HA. These formed 3.5 slip-shaped pores between the rods. Using high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM), they observed that single crystals of HA may grow in the (002) direction of the HA structure.⁴⁵

Of the eight independent experimental conditions possible for a 2^3 factorial design, seven different effects could be calculated: three individual, three secondary and one tertiary interaction. The effects labeled E_1 , E_2 and E_3 were considered individual effects and stand for the effects respective only to each isolated factor. The effects E_{12} , E_{13} and E_{23} show the combined effect of two factors, and the effect labeled E_{123} denotes the combined effect of the three factors of the factorial design. Only effects with values greater than 5% were evaluated as significant; therefore, all effects of temperature (E_1), time (E_2) and concentration of salts (E_3) and the effects arising from the interaction of factors (E_{12} , E_{23} and E_{13}), as well as the effect labeled E_{123} , could be considered significant effects, and a model accounting for one independent coefficient (b_0) and seven different coefficients (b_1 , b_2 , b_3 , b_{12} , b_{13} , b_{23} , b_{123}) for each of the effects was proposed (equation 2). Finally, by solving the matrix equation $b = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}'\mathbf{Y}$, equation 3 was obtained, which describes the model.

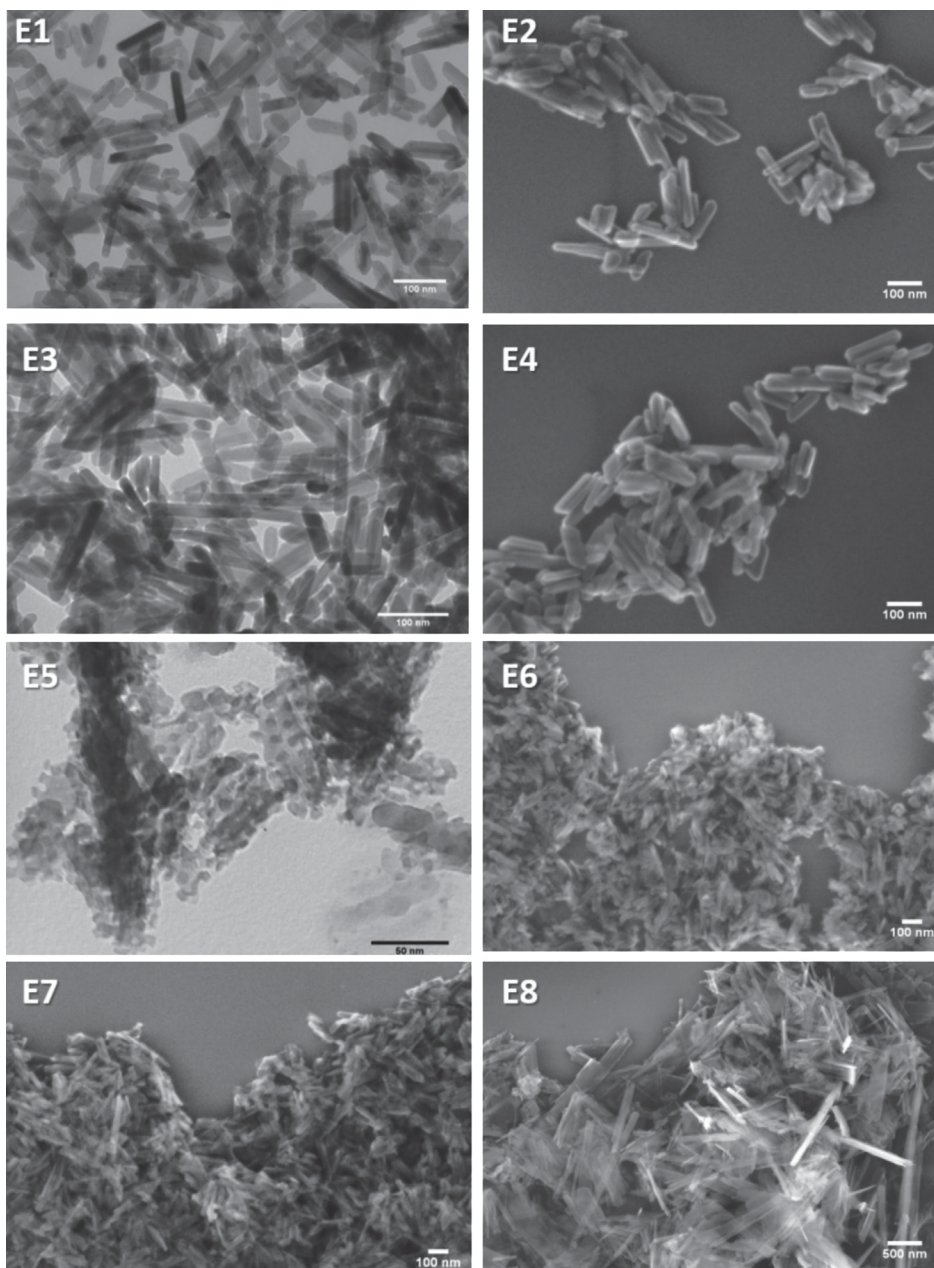


Figure 4. Electron microscopy images of HA nanoparticles synthesized with different experimental conditions, as presented in Table 1: E1 (TEM, scale bar value 100 nm); E2 (SEM, scale bar value 100 nm); E3 (TEM, scale bar value 100 nm); E4 (SEM, scale bar value 100 nm); E5 (TEM, scale bar value 50 nm); E6 (SEM, scale bar value 100 nm); E7 (SEM, scale bar value 100nm); and E8 (SEM, scale bar value 500 nm).

$$y = 151.08 + 81.67T + 78.67t + 38.83C + 57.08T \times t + 60.42T \times C + 75.42t \times C + 56.83T \times t \times C \quad (2)$$

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad (3)$$

In equations 2 and 3, the X_1 variable represents the coded value (-1 or $+1$) of the temperature (T), X_2 represents the coded value of the time (t) and X_3 represents the coded value of the precursor concentrations (C) (Table 1). By inserting the coded values of each variable in equation 2, it

was possible to calculate the predicted particle size for each experiment, and consequently, to compare the predicted values with those obtained experimentally; also, the error or residues could be evaluated. The predicted particle size values and the respective residuals, in absolute and percentage values, are displayed in Table 4, which shows the analysis of variance (ANOVA). The table partitions the variability in particle size into separate pieces for each of the effects. It then tests the statistical significance of each effect by comparing the mean square against an estimate of the experimental error.

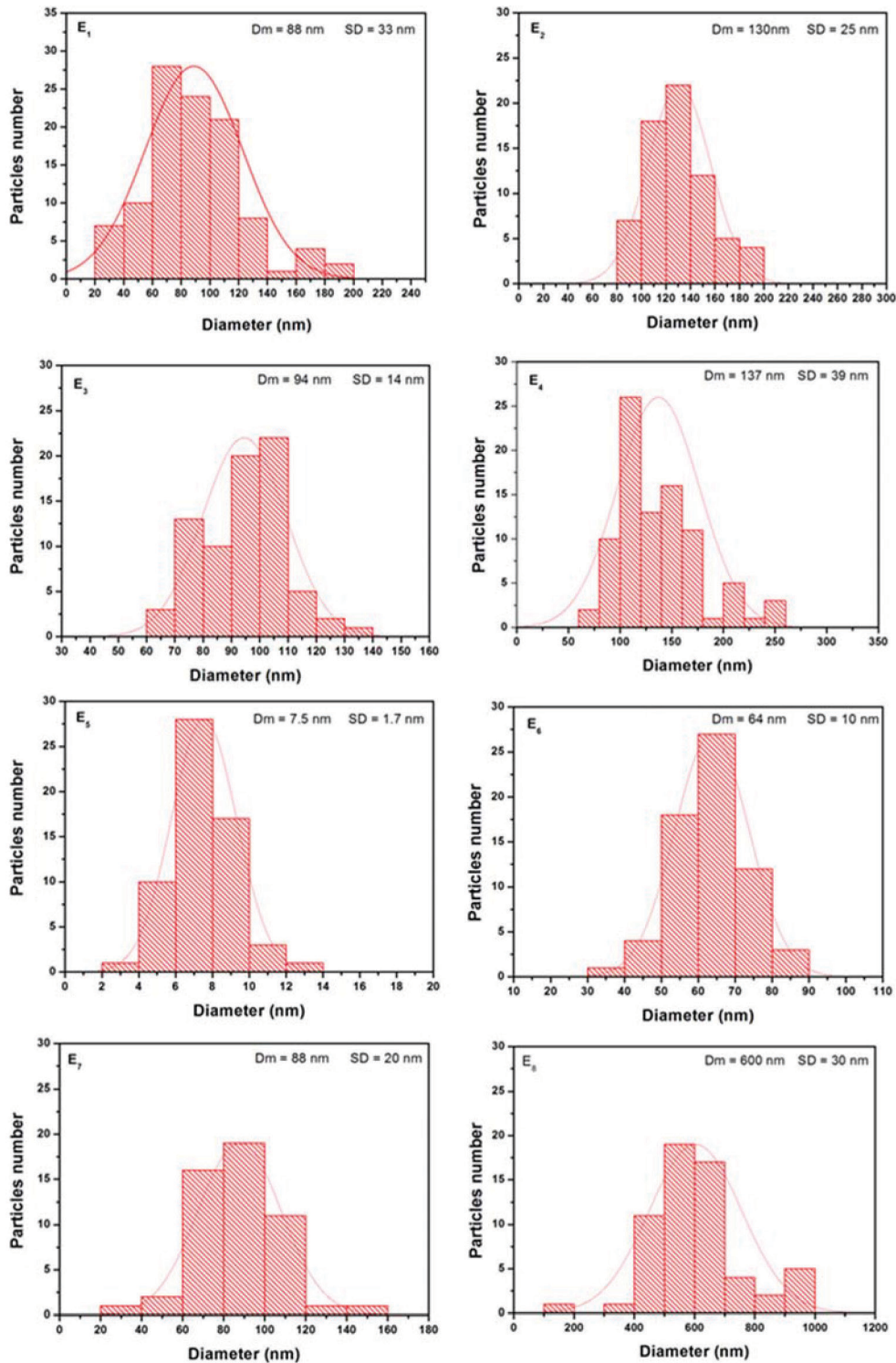


Figure 5. Histograms of size distributions of HA nanoparticles obtained from SEM and TEM images.

The R-squared statistic indicated that the model as fitted explains 95.0121% of the variability in particle size. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, was 92.8298%. The standard error of the estimate showed that the standard deviation of the residuals was

52.7082. The mean absolute error (MAE) of 22.3729 was the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine whether there was any significant correlation based on the order in which they occur in the data file. Since the p -value was greater than 5.0%, there was no indication of serial autocorrelation

Table 3. Factorial design matrix and average particle size describing the HA nanoparticle prepared in each experiment. Temperature, time and precursor concentration were the variables studied. The calculated effects for the factorial design are also presented

Experiment	T	t	C	Particle size / nm
1	-1	-1	-1	88 ± 33
2	+1	-1	-1	130 ± 25
3	-1	+1	-1	94 ± 14
4	+1	+1	-1	137 ± 39
5	-1	-1	+1	7.5 ± 1.7
6	+1	-1	+1	64 ± 10
7	-1	+1	+1	88 ± 20
8	+1	+1	+1	600 ± 30

Effects						
T	t	C	Tt	TC	tC	TtC
163	157	77	114	121	151	114

T: temperature; t: time; C: precursor concentration.

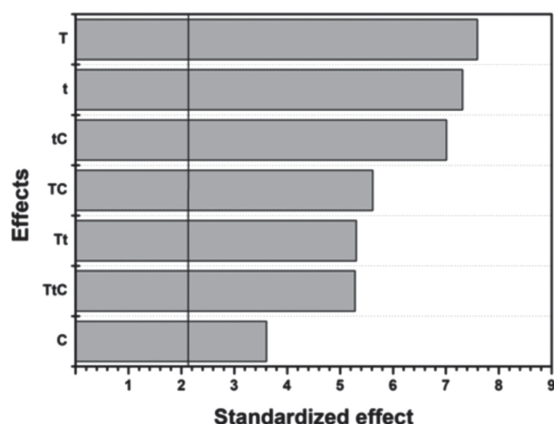


Figure 6. Pareto plot showing the standardized value of mean effect and secondary and tertiary effects.

in the residuals at the 5.0% significance level. The model was statistically significant. Since the effect due to the precursor concentrations (C) had the lowest standard value, it was possible to yield particles with two different ranges regarding their sizes by fixing C in either the upper or lower levels. For instance, by fixing the C factor to +1

(0.10 mol L⁻¹), there was a trend to yield bigger particles, whereas smaller particles were expected to be fixed as C = -1 (0.03 mol L⁻¹).

Figure 7a shows that when the C factor was +1, the response surface yielded particle sizes ranging from 7.5 to 600 nm. Meanwhile, Figure 7b shows that surface response yielded values ranging from 88 to 137 nm for C = -1. In summary, Figures 7a and 7b show that within the proposed factorial design and with the model obtained, it was possible to fine-tune the particle size in a range from 7.5 to 600 nm. This represents a great aid for future researches, since many applications of HA nanoparticles are dependent on different particles size.

The results demonstrated that at lower concentrations, the temperature increase was the factor that presented the greatest effect on the model, affecting the size of the nanoparticles; in this case, nanoparticles with a rod format were always obtained. At the higher concentration, both time and temperature influenced the size of the nanoparticles, and resulted in nanoparticles of different shapes. In syntheses using higher reagent concentrations (0.10 mol L⁻¹), the increase in times and temperature resulted in a significant increase in the size of the nanoparticles. Additionally, the variation of initial conditions significantly altered the shape of the nanoparticles. Jin *et al.*²⁵ studied the effect of time and temperature modification on the hydrothermal synthesis of HA nanorods in the presence of sodium citrate and observed that with increasing temperature and time, there was an increase in both rod length and width. In addition, in the studied temperature range, they observed that HA nanorods were obtained from primary particles formed in the aqueous phase instead of aggregates or large clusters. Kuśnieruk *et al.*⁴⁶ studied that HA nanoparticles morphology depended on the executed process parameters in the hydrothermal synthesis. They observed that synthesis temperature increase leads to more regular and spherical HA particles. They have proved that synthesis

Table 4. Corresponding ANOVA table for the proposed model

Source	Sum of squares	Df	Mean square	F-Ratio	p-Value
Temperature (T)	160148	1	160148	256.60	0.0000
time (t)	148601	1	148601	238.10	0.0000
Concentration (C)	36153	1	36153	57.93	0.0001
Tt	78147	1	78147	125.21	0.0000
TC	87664	1	87664	140.46	0.0000
tC	136580	1	136580	218.84	0.0000
TtC	77463	1	77463	124.12	0.0001
Total error	5696	16	406.886	-	-
Total	734744	23	-	-	-

Df: degrees of freedom; F-ratio: F-test at the confidence limit of 95%; p-value: p-test, significant effects $p < 0.05$.

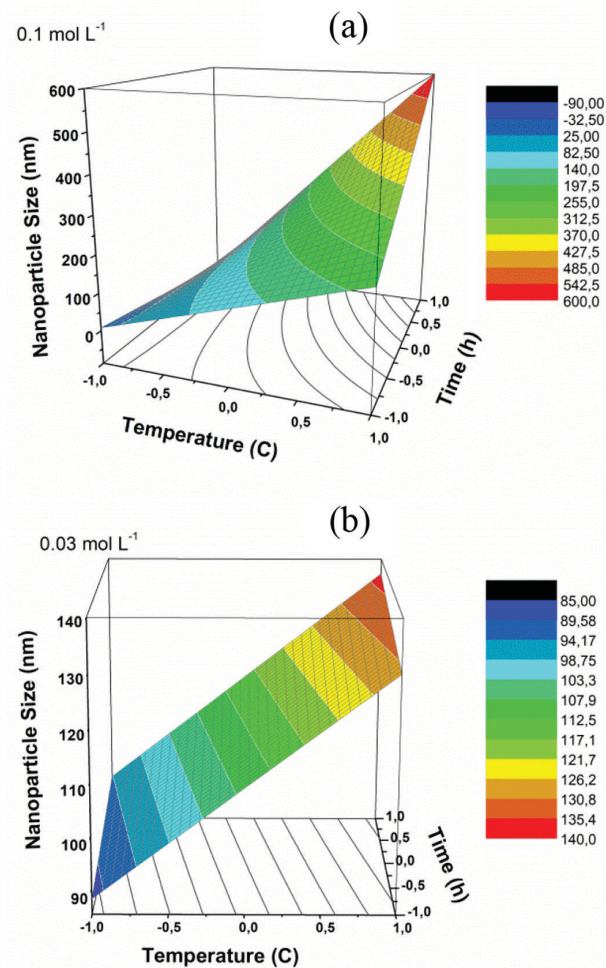


Figure 7. Surface responses of HA nanoparticle size by fixing the salt concentration in the level (a) +1 (0.10 mol L⁻¹) and (b) -1 (0.03 mol L⁻¹).

at a low temperature leads to HA crystals with needle morphology, which is confirmed by the SEM and TEM results of type 1 HA nanopowder. Pang *et al.*⁴⁰ synthesized HA nanoparticles at low temperatures, and obtained particles that were slightly thinner and longer, and more irregular, having less distinct borders. Additionally, these particles tend to form agglomerates. It was also shown that the higher the crystallinity of the powder, the more regular the shape of the particle obtained with ripening time and temperature synthesis increase.

The results show that temperature was the main driving force for crystal growth in the hydrothermal process and is one of the key factors for the preparation of rod-like HA nanoparticles because higher temperatures promote oriented attachment growth. According to Sadat-Shojai *et al.*,¹⁹ in lower temperatures the counter ions, such as K⁺, SO₄²⁻, and Cl⁻, have a considerable influence on the morphology of the resultant nanoparticles. The use of SO₄²⁻ ions leads to nanoplatelets, possibly due to the strong interaction between Ca²⁺ and SO₄²⁻ ions, while

K⁺ ions hindered the growth of nanocrystals due to the interaction between K⁺ and OH⁻ or PO₄³⁻ ions. Cl⁻ ions could help to form nanorods, possibly due to the increase in solution polarity. This study demonstrated that the HA nanoparticles with modified shape could be prepared by using the combined effects of temperature and counter ions, which are simple, inexpensive and eco-friendly.^{23,26}

Conclusions

HA nanoparticles were successfully synthesized by hydrothermal method using friendly synthesis conditions. Due the conditions and experiments studied, homogeneous colloidal nanoparticles were obtained in their form and crystallinity, having a selective chemical composition, being this a reproducible and simpler method. Synthesis optimization was performed using factorial design where it was possible to control shape and size of the nanoparticles. Through this approach it was possible to construct an empirical mathematical model, which enabled to develop a surface response plot to screen the synthetic system. The characterization using XRD showed that HA nanoparticle is composed of pure hexagonal phase that confirms the homogeneity of the synthesized materials. The structure was corroborated by TEM and SEM images, which also showed that HA nanoparticles had well-defined nanorod forms and narrow size distributions with sizes between 8 and 600 nm, formed by oriented attachment growth mechanism. Raman spectra analyses showed that the presence of β -TCP phase in HA nanoparticles can improve the mechanical stability and bioactivity. The HA nanoparticles morphological analysis demonstrated that these properties are affected by synthesis conditions and the main parameter for the growth of crystals in the hydrothermal process was temperature. These results demonstrate the possibility of maximizing the synthesis control of the HA nanoparticles by using a factorial design, a simple but not simplistic methodology.

Acknowledgments

We would like to thank Universidade Federal de Goiás and Instituto Federal Goiano for structural support as well as FINEP, FAPEG, CNPq and CAPES for continued financial support and scholarships.

References

1. Feng, Q. L.; Cui, F. Z.; Wang, H.; Kim, T. N.; Kim, J. O.; *J. Cryst. Growth* **2000**, *210*, 735.
2. Storz, O.; Gasthuber, H.; Woydt, M.; *Surf. Coat. Technol.* **2001**, *76*, 140.

3. Almeida Filho, E.; Assis, C. M.; Vercik, L. O.; Guastaldi, A. C.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1229.
4. Roveri, N.; Iafisco, M.; *Nanotechnol., Sci. Appl.* **2010**, *3*, 107.
5. Wang, H.; Li, Y.; Zuo, Y.; Li, J.; Ma, S.; Cheng, L.; *Biomaterials* **2007**, *28*, 3338.
6. Shin, H.; Jo, S.; Mikos, A. G.; *Biomaterials* **2003**, *24*, 4353.
7. Valima, T.; Laaksovirta, S.; *Biomaterials* **2004**, *25*, 1225.
8. Cangemi, J. M.; Santos, A. M.; Claro Neto, S. E.; Chierice, G. O.; *Polim.: Cienc. Tecnol.* **2008**, *18*, 201.
9. Varadarajan, N.; Balu, R.; Rana, D.; Ramalingam, M.; Sampath Kumar, T. S.; *J. Biomater. Tissue Eng.* **2014**, *4*, 295.
10. Guastaldi, A. C.; *Metal. Mater.* **2003**, *59*, 442.
11. Choi, D.; Marra, K. G.; Kumta, P. N.; *Mater. Res. Bull.* **2004**, *39*, 417.
12. Tampieri, A.; Celotti, G.; Landi, E.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 568.
13. Cai, Y.; Tang, R.; *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 3775.
14. Roveri, N.; Palazzo, B.; Iafisco, M.; *Expert Opin. Drug Delivery* **2008**, *5*, 861.
15. Leena, M.; Rana, D.; Webster, T. J.; Ramalingam, M.; *Mater. Chem. Phys.* **2016**, *180*, 166.
16. Murakami, S.; Kato, K.; Enari, Y.; Kamitakahara, M.; Watanabe, N.; Ioku, K.; *Ceram. Int.* **2012**, *38*, 1649.
17. Jin, X.; Zhuang, J.; Zhang, Z.; Guo, H.; Tan, J.; *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *443*, 125.
18. Zhao, X. Y.; Zhu, Y. J.; Lu, B. Q.; Chen, F.; Qi, C.; Zhao, J.; Wu, J.; *Mater. Res. Bull.* **2014**, *55*, 67.
19. Sadat-Shojai, M.; Atai, M.; Nodehi, A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 571.
20. Chen, Z.; Fu, Y.; Cai, Y.; Yao, J.; *Mater. Lett.* **2012**, *68*, 361.
21. Gao, S.; Sun, K.; Li, A.; Wang, H.; *Mater. Res. Bull.* **2013**, *48*, 1003.
22. Okada, M.; Furuzono, T.; *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *360*, 457.
23. Dhand, V.; Rhee, K. Y.; Park, S.-J.; *Mater. Sci. Eng., C* **2014**, *36*, 152.
24. Bakan, F.; Laçin, O.; Sarac, H.; *Powder Technol.* **2013**, *233*, 295.
25. Jin, X.; Chen, X.; Cheng, Y.; Wang, L.; Hu, B.; Tan, J.; *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *450*, 151.
26. Wang, L.; Weng, L.; Wang, L.; Song, S.; *J. Ceram. Soc. Jpn.* **2010**, *118*, 1195.
27. Wijesinghe, W. P. S. L.; Mantilaka, M. M. M. G. P. G.; Premalal, E. V. A.; Herath, H. M. T. U.; Mahalingam, S.; Edirisinghe, M.; Rajapakse, R. P. V. J.; Rajapakse, R. M. G.; *Mater. Sci. Eng., C* **2014**, *42*, 83.
28. Arantes, T. M.; Pinto, A. H.; Leite, E. R.; Longo, E.; Camargo, E. R.; *Colloids Surf., A* **2012**, *415*, 209.
29. Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Deming, S. N.; Michotte, Y.; Kaufman, L.; *Chemometrics: A Textbook*; Elsevier: Amsterdam, 1988.
30. Jillavenkatesa, A.; Condrate, R. A.; *Spectrosc. Lett.* **1997**, *30*, 1561.
31. Nosenko, N. V.; Strutynska, N.; Vorona, I.; Zatovsky, I.; Dzhagan, V.; Lemishko, S.; Epple, M.; Prymak, O.; Baran, N.; Ishchenko, S.; Slobodyanik, N.; Prylutsky, Y.; Klyui, N.; Temchenko, V.; *Nanoscale Res. Lett.* **2015**, *10*, 464.
32. Bhattacharjee, P.; Naskar, D.; Maiti, T. K.; Bhattacharya, D.; Kundu, S. C.; *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *472*, 16.
33. *GUI Octave*, version 3.6, GNU, United States, 2017.
34. *Image J*, version 1.5.1, NIH, United States, 2017.
35. Scherrer, P.; *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-Phys. Kl.* **1918**, *26*, 98.
36. Langford, J. I.; Wilson, A. J. C.; *J. Appl. Crystallogr.* **1978**, *11*, 102.
37. Rudolph, W. W.; Irmer, G.; *Appl. Spectrosc.* **2007**, *61*, 1312.
38. Sauer, G. R.; Zunic, W. B.; Durig, J. R.; Wuthier, R. E.; *Calcif. Tissue Int.* **1994**, *54*, 414.
39. Manoj, M.; Subbiah, R.; Mangalaraj, D.; Ponpadian, N.; Viswanathan, C.; Park, K.; *Nanobiomedicine* **2015**, *2*, 1.
40. Pang, Y. X.; Bao, X.; *J. Eur. Ceram. Soc.* **2003**, *23*, 1697.
41. Kim, H.; Camata, R. P.; Vohra, Y. K.; Lacefield, W. R.; *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2005**, *16*, 961.
42. El-Bahy, G. S.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *122*, 3270.
43. Wang, M.; Qian, R.; Bao, M.; Gu, C.; Zhu, P.; *Mater. Lett.* **2018**, *210*, 203.
44. Jokić, B.; Mitrić, M.; Radmilović, V.; Drmanić, S.; Petrović, R.; Janačković, D.; *Ceram. Int.* **2011**, *37*, 167.
45. Chen, J. D.; Wang, Y. J.; Wei, K.; Zhang, S. H.; Shi, X. T.; *Biomaterials* **2007**, *28*, 2275.
46. Kuśnieruk, S.; Wojnarowicz, J.; Chodara, A.; Chudoba, T.; Gierlotka, S.; Lojkowski, W.; *Beilstein J. Nanotechnol.* **2016**, *7*, 1586.

Submitted: January 3, 2018

Published online: March 27, 2018