

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA SANTELLI BARDUCCI

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROXIAPATITA NUCLEADA A PARTIR
DE POLISSACARÍDEO SULFATADO PARA ENXERTIA ÓSSEA**

LONDRINA

2023

GABRIELA SANTELLI BARDUCCI

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROXIAPATITA NUCLEADA A PARTIR
DE POLISSACARÍDEO SULFATADO PARA ENXERTIA ÓSSEA**

**Synthesis and characterization of nucleated hydroxyapatite from sulfated
polysaccharide for bone grafting**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Materiais da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Renato Márcio Ribeiro Viana.

Coorientador: Luís Fernando Cabeça.

LONDRINA

2023



Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

GABRIELA SANTELLI BARDUCCI

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROXIAPATITA NUCLEADA A PARTIR
DE POLISSACARÍDEO SULFATADO PARA ENXERTIA ÓSSEA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Materiais da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 22/junho/2023

Renato Márcio Ribeiro Viana
Doutorado em Química
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Delia do Carmo Vieira
Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Joice Erica Motezuki
Mestrado em Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

LONDRINA
2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e meu irmão pelo apoio e incentivo incondicionais ao longo de todos esses anos, por acreditarem e torcerem por mim mesmo à distância. Sou imensamente grata por tudo o que fizeram por mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana, gostaria de expressar minha sincera gratidão pelos conhecimentos compartilhados e pela confiança depositada em mim. Seu apoio e orientação foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa e para o meu crescimento.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Luís Fernando Cabeça, cujo apoio foi fundamental para a realização desta pesquisa, pelos ensinamentos, disponibilidade e suporte durante esse tempo.

A autora gostaria de agradecer ao Laboratório Multiusuário do Câmpus Londrina da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelas análises realizadas.

Aos demais professores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, que fizeram parte da minha jornada acadêmica. Agradeço a cada um de vocês pelos ensinamentos e pela colaboração no meu desenvolvimento.

Por fim, gostaria de estender meus agradecimentos a todos os amigos e colegas que estiveram ao meu lado durante essa jornada.

RESUMO

A hidroxiapatita (HAP) é o principal mineral que constitui os ossos e dentes dos vertebrados. Porém, apesar das suas boas características de biocompatibilidade e bioatividade em comparação aos ossos, este material apresenta pouca quantidade de poros, dificultando o desenvolvimento das células ósseas. Com o objetivo de melhorar a porosidade do material que será enxertado, a HAP foi sintetizada na presença de um polissacarídeo sulfatado, mais especificamente um derivado da celulose microcristalina. A sulfatação da celulose foi feita como forma de criação de cargas negativas na estrutura molecular, o que nucleou a hidroxiapatita. Com a quantificação do grau de substituição, utilizando a espectroscopia no ultravioleta, foi possível observar um resultado igual a 1, significando que cada unidade de glicose ocorre uma modificação de uma hidroxila por um grupo sulfato. Quando foi feita a sinterização deste material combinado, o polissacarídeo foi eliminado, confirmado através da espectroscopia no infravermelho. A porosimetria por intrusão de mercúrio e a microscopia eletrônica de varredura foram realizadas para a caracterização do material, identificando a morfologia desta nova HAP e os diâmetros dos poros na estrutura. Observou-se uma maior homogeneidade nos poros, indicando uma menor distribuição de tamanho após a expulsão do polissacarídeo sulfatado. Logo, concluiu-se que a metodologia utilizada apresentou ótimos resultados de grau de sulfatação na estrutura do polissacarídeo, além de obter um material com distribuição de poros mais regulares, embora com tamanho ainda menores que o desejado para sua aplicação biomédica.

Palavras-chave: celulose microcristalina, sulfatação, enxerto ósseo, hidroxiapatita.

ABSTRACT

Hydroxyapatite (HA) is the main mineral that makes up the bones and teeth of vertebrates. However, despite its good characteristics of biocompatibility and bioactivity compared to bones, this material has a small amount of pores, hindering the development of bone cells. In order to improve the porosity of the material to be grafted, HA will be combined with a sulfated polysaccharide, more specifically microcrystalline cellulose. The sulfation of cellulose, in this case, will be done as a way of creating negative charges in the molecular structure, which will nucleate the synthesis of hydroxyapatite. With the quantification of the degree of substitution, using ultraviolet spectroscopy, it was possible to observe a result equal to 1, meaning that each unit of glucose occurs a modification of a hydroxyl by a sulfate group. When this combined material was sintered, the polysaccharide was eliminated, confirmed by infrared spectroscopy. Mercury intrusion porosimetry and scanning electron microscopy were performed for the characterization of the material, identifying the morphology of this new HA and the diameters of the pores in the structure. A greater homogeneity was observed in the pores, indicating a smaller size distribution after the expulsion of the sulfated polysaccharide. Therefore, it is concluded that the methodology used presented excellent results regarding the degree of sulphation in the structure of the polysaccharide, in addition to obtaining a material with more regular pores, although with a size even smaller than the desired one for its biomedical application.

Keywords: microcrystalline cellulose, sulphation, bone graft, hydroxyapatite.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	OBJETIVOS	8
2.1	Objetivo Geral	8
2.2	Objetivos Específicos	8
3	JUSTIFICATIVA	9
4	REFERENCIAL TEÓRICO	10
4.1	Enxerto ósseo.....	10
4.2	Celulose Microcristalina (MCC).....	12
4.3	Hidroxiapatita (HAP).....	13
5	MATERIAIS E MÉTODOS	15
5.1	Materiais	15
5.1.1	Solventes e Reagentes	15
5.2	Métodos Analíticos	15
5.2.1	Espectroscopia por absorção no infravermelho	15
5.2.2	Espectroscopia por absorção no ultravioleta.....	15
5.2.3	Porosimetria por intrusão de mercúrio.....	15
5.3	Sulfatação da celulose	16
5.3.1	Método A	16
5.3.2	Método B	17
5.4	Quantificação do grau de sulfatação	18
5.4.1	Hidrólise da amostra sulfatada	19
5.5	Síntese da hidroxiapatita	20
5.6	Síntese da hidroxiapatita sobre o polissacarídeo sulfatado	20
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
6.1	Formação da celulose microcristalina sulfatada	22
6.2	Determinação do grau de substituição	23
6.3	Espectroscopia no infravermelho das amostras sinterizadas	24
6.4	Imagens do MEV das amostras sinterizadas	25
6.5	Porosimetria por intrusão de mercúrio	26
7	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

O osso possui uma função muito importante no corpo humano de proteção dos órgãos vitais e de sustentação. Osso natural é um material compósito feito por compostos orgânicos híbridos e constituintes inorgânicos. A população está exposta a condições contínuas de lesões e, como em algumas situações o osso é incapaz da capacidade de regeneração, os enxertos ósseos são necessários. Devido aos avanços às pesquisas de biomateriais, é possível a fabricação artificial de materiais que imitam a estrutura do osso natural como forma de ser usado como precursor de desenvolvimento ósseo (LE, H.; NATESAN, K., 2015).

Os biomateriais à base de polímeros apresentam um papel crucial para o aumento da qualidade de vida dos seres humanos, pelas suas características de biocompatibilidade, flexibilidade, resistência e biodegradação que gera produtos atóxicos, além de baixo custo e facilidade de processamento.

Atualmente, como uma forma de utilizar os métodos sintéticos na área de enxertia óssea, uma estratégia bastante utilizada é a formação de misturas de materiais poliméricos e a hidroxiapatita, pois é um biomaterial que atende as especificações para a formação do osso. É necessário que o material utilizado seja classificado como osteogênico, osteocondutor e osteoindutor.

Estudos apontam que a hidroxiapatita (HAP) é a principal substância inorgânica que pode ser estudada extensivamente para aplicações médicas, devido à sua excelente bioatividade e biocompatibilidade. No entanto, a HAP pura sinterizada tem baixa tenacidade à fratura e baixas propriedades de degradação, que limitam seu uso apenas em aplicações sem estresse. Pesquisas anteriores mostraram que pode ser formado um compósito semelhante à estrutura do tecido ósseo natural combinando uma mistura de macromoléculas naturais e a hidroxiapatita (LE, H.; NATESAN, K., 2015).

Diante do exposto, o presente trabalho concentra-se no desenvolvimento de enxerto ósseo através da síntese de hidroxiapatita com polissacarídeo sulfatado, um material polimérico, a fim de gerar uma estrutura com poros mais adequados para a sua aplicação. O desenvolvimento deste biomaterial pode trazer um grande avanço na área da saúde, possuir possíveis resultados relevantes, principalmente na alteração da morfologia na estrutura para conseguir chegar nos parâmetros esperados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento e caracterização de um material poroso para enxerto ósseo formado pela mistura de um polissacarídeo, celulose microcristalina sulfatada e a hidroxiapatita.

2.2 Objetivos Específicos

- Sulfatação do polissacarídeo;
- Caracterização do polissacarídeo sulfatado por meio da quantificação do grau de sulfatação com espectroscopia no ultravioleta visível e análise de bandas no infravermelho;
- Sinterização da hidroxiapatita sobre o polissacarídeo sulfatado;
- Caracterização do material obtido através de espectroscopia no infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e porosimetria por intrusão de mercúrio.

3 JUSTIFICATIVA

Atualmente, o principal material para enxertia óssea, com melhor compatibilidade, é a hidroxiapatita de origem bovina. Entretanto, ela carrega sempre risco biológico para o paciente. O desenvolvimento de enxertos sintéticos tem avançado bastante com o objetivo de diminuir os riscos de contaminações, reduzir custos e obtenção em maior escala. Entretanto, boa parte destes materiais, embora sejam biocompatíveis, não apresentam poros de tamanhos necessários, o que impede ou dificulta o crescimento de células no interior do enxerto para formação de nova matriz óssea. Portanto, o material proposto neste projeto visa atender a ambas as demandas: biocompatibilidade, por se tratar da hidroxiapatita, um mineral constituinte nos ossos e dentes dos vertebrados, e a porosidade necessária para o crescimento das células no interior do enxerto, sendo alcançada através da síntese da hidroxiapatita sobre um polissacarídeo sulfatado.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Enxerto ósseo

Para o desenvolvimento de novos materiais e opções de substitutos ósseos, é fundamental o conhecimento das propriedades físicas, químicas e mecânicas do osso humano, o qual é um compósito cerâmico-orgânico constituído principalmente de colágeno (20%), fosfato de cálcio (69%), água (9%) e outras substâncias orgânicas, como proteínas, polissacarídeos e lipídios, que estão presentes em pequenas quantidades. O fosfato de cálcio está em forma de hidroxiapatita cristalizada, garantindo rigidez óssea. O componente mineral do osso também é semelhante a hidroxiapatita, mas contém flúor, magnésio, sódio e outros íons como impurezas (ORLOVSKII, V.P.; KOMLEV, V.S.; BARINOV, S, 2002).

Com as diversas classes de enxertos para a aplicação, eles são classificados através da natureza do material utilizado. São eles: autógenos, alógenos e xenógenos (SILVEIRA, E da, 2015). O enxerto autógeno ocorre quando o material utilizado é recolhido do próprio paciente. Por essa razão apresentam excelentes características de aceitação pelo organismo e uma ótima osteoindução, porém, é somente indicado quando necessário em pequenas escalas, limitando sua aplicação. A enxertia alógena acontece quando o material utilizado é recolhido de uma outra pessoa, que possui características genéticas distintas, e, por esse motivo, a propriedade de osteoindução é perdida, diminuindo o potencial de desenvolvimento das células, além de possuir riscos de contaminação por doenças ou chances graves de rejeição, por apresentarem moléculas clássicas de histocompatibilidade diferentes. O xenógeno é caracterizado por ser um material advindo de outra espécie, podendo ser bovina ou suína. Entretanto, esse possui um risco de rejeição do paciente, além de levar patógenos ao hospedeiro e, portanto, sendo uma opção pouco favorável ambientalmente (SILVA, L.P.B, 2022).

No século XVII, foram realizados os primeiros experimentos em seres humanos, utilizando o método xenógeno. No século XIX, começaram a ser realizados enxertos ósseos autógenos e, desde então, houve avanços nos experimentos alógenos. Porém, todas essas técnicas apresentam limitações nas suas aplicações (SILVEIRA, E da, 2015).

Como forma de aumentar o leque de opções para enxertia óssea, buscando superar as limitações dos métodos até então utilizados, os estudos de biomateriais foram aumentando cada vez mais e, com isso, foi possível o desenvolvimento dos aloplásticos, que são de origem sintética. O gesso foi a primeira cerâmica considerada como um possível substituto para o osso em 1894. Entretanto, por apresentar uma resistência mecânica baixa, uma alta absorção no organismo e ocasionando uma rápida fragmentação e degradação, descartou essa biocerâmica como uma opção de implante. Na década de 70, o estudo em cima de materiais cerâmicos foi mais intenso, sendo descoberto as biocerâmicas e são utilizadas até hoje, como a alumina densa, que apresenta uma boa biocompatibilidade e elevada resistência mecânica. Zircônia, o dióxido de titânio, os fosfatos de cálcio e as vitrocerâmicas de sílica/fosfato, também são muito utilizadas atualmente (KAWACHI, E. Y., et al, 2000).

Além da biocompatibilidade, têm que ser levado em conta outros requisitos para um substituto ósseo, como ser osteogênico, que são materiais capazes de estimular a formação de osso diretamente a partir de osteoblastos, osteocondutor, que permite a aposição de um novo tecido ósseo, e osteoindutor, para ser capaz de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, aumentando a formação óssea no local, estimulando a formação do osso (SCOMBATTI, S. L, 2020).

A porosidade dos biomateriais utilizados no enxerto ósseo tem grande influência nas propriedades e na eficiência. Em 1970, Hulbert demonstrou que poros maiores que 100 μm favorecem o crescimento do osso através do material, por estar relacionada ao desenvolvimento de um sistema de vasos capilares entremeado com a cerâmica porosa. Além disso, segundo o subcomitê para a caracterização de sólidos porosos da IUPAC, materiais macroporosos são definidos por apresentarem poros com dimensões maiores que 50 μm . Então, um material precisa ter poros na ordem do diâmetro Harvesiano (50 a 250 μm) para ser considerado macroporoso. Para a obtenção de cerâmicas com poros dessa grandeza, pode ser utilizado polímeros durante seu processamento, o qual é eliminado posteriormente durante as etapas, formando os poros (KAWACHI, E. Y., et al, 2000).

Então, há fatores essenciais para a escolha do material que vai ser enxertado. Segundo Sepúlveda (1999), os principais requisitos estão ligados à estrutura porosa formada, a resistência mecânica e as restrições quanto à aplicação. Além disso, o material só pode ser utilizado como enxerto depois de passar por uma avaliação

biológica *in vitro*, que são testes de citotoxicidade. Depois, testes *in vivo* são feitos para verificar a biocompatibilidade com a fisiologia do corpo humano. E, por fim, é verificado a biofuncionalidade.

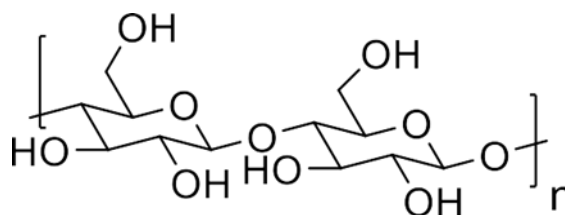
Com o objetivo de alcançar todos os parâmetros desejados para os biomateriais que serão utilizados na enxertia óssea, vários compósitos feitos de polímeros biodegradáveis e hidroxiapatita estão sendo estudados (HIGASHI, S., et al, 1986). A integração desses componentes pode ser realizada submetendo o polímero durante a sinterização da hidroxiapatita, a presença do polímero é a chave para alcançar a integridade estrutural e mecânica do compósito final, alcançando a porosidade necessária para o enxerto ósseo (KUTIKOV, A. B., SONG, J., 2013).

4.2 Celulose Microcristalina (MCC)

A celulose microcristalina é formada por cadeias de celulose cristalina, sendo obtida por meio do processo de hidrólise ácida. Este procedimento remove a maior parte da fração amorfa, que são partes orientadas aleatoriamente na estrutura, atuando como “defeitos”, e inibe a morfologia das fibras de celulose, deixando intactas as regiões cristalinas (MORAES, K.K., et al, 2018). Há várias fontes comuns para a produção da celulose microcristalina, como a polpa de madeira, algodão, sisal, bagaço de cana, resíduos agrícolas etc (OLIVEIRA, M.M. de, 2018).

Em sua forma natural, a MCC (Figura 1) é apresentada como um pó cristalino, inodoro, insípido e praticamente isenta de contaminantes orgânicos e inorgânicos. A insolubilidade em água, em ácidos diluídos e na maioria dos solventes orgânicos faz com que apresente baixa absorção sistêmica, não possuindo então potencial tóxico ou irritante (SODRÉ, M.A., et al, 2012). Devido à grande crescente busca por alternativas aos materiais sintéticos na área farmacêutica, médica, cosmética e alimentícias, a celulose microcristalina está se tornando cada vez mais estudada por conta da sua renovabilidade, não toxicidade, valor econômico, biodegradabilidade, altas propriedades mecânicas, alta área superficial e biocompatibilidade (TRACHE, D., et al, 2016).

Figura 1 - Estrutura química da celulose microcristalina



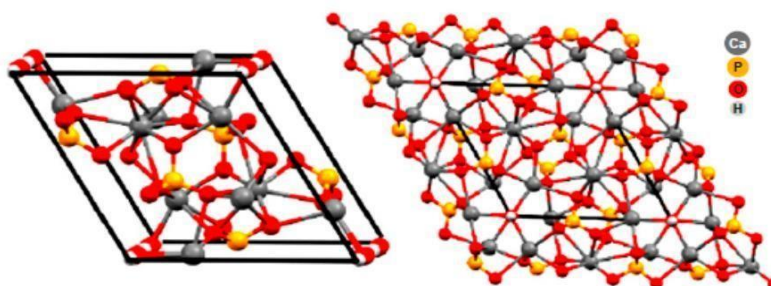
Fonte: Autoria própria (2023).

Com o objetivo de alcançar a porosidade ideal nos materiais que serão enxertados, a celulose microcristalina vem sendo muito estudada por apresentar bons resultados na aplicação como material gerador de poros. Isso se deve ao fato de, por ser um material orgânico natural, não gerar resíduos que podem ser prejudiciais ao paciente (SILVA, L.P.B, 2022).

4.3 Hidroxiapatita (HAP)

A hidroxiapatita, na qual hidroxí é a hidroxila (OH^-) ligada a apatita, nome do mineral fosfato de cálcio, é um ortofosfato de cálcio cuja fórmula molecular é $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ e com estrutura representada na Figura 2. Porém, a célula unitária cristalina compreende duas moléculas, sendo comumente utilizado sua fórmula química hexagonal, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Através de estudos feitos por difração de raios X e de nêutrons, obteve-se que a HAP possui uma razão atômica Ca/P de 1,67, que representa a razão entre 10 elementos de cálcio e os 6 elementos de fósforo (GARCIAS, N. C. de C. A, 2021). Além disso, por sua estrutura molecular apresentar íons cálcio (Ca^{2+}), Magnésio (Mg^{2+}), Sódio (Na^{2+}) e CO_3^{3-} , a sua superfície permite interações do tipo dipolo, o que induz a absorção de moléculas de água, proteínas e colágeno, favorecendo uma regeneração tecidual (FREITAS, L.A, 2020).

Figura 2 - Estrutura molecular da hidroxiapatita



Fonte: GOMES, D. S., et al. (2019).

A HAP é o principal constituinte mineral dos ossos e dentes dos vertebrados. Nos últimos anos, estudos vêm sendo realizados sobre a aplicação da HAP em biomateriais artificiais devido ao aumento significativo da biocompatibilidade e bioatividade no material aplicado. Dessa forma, busca-se o desenvolvimento de rotas envolvendo novos recursos científicos e econômicos, podendo variar as propriedades de forma eficaz de acordo com os parâmetros de processamento (SADAT-SHOJAI, M., et al, 2013).

A síntese da hidroxiapatita pode ser feita através de vários métodos, o qual possibilita a obtenção com diferentes características e propriedades. Os métodos são divididos em métodos secos, métodos úmidos, método hidrotermal, método de altas temperaturas, síntese baseada em fontes biogênicas e a combinação dos métodos mencionados (GOMES, D. S., et al, 2019).

A rota utilizada neste trabalho é por via úmida, que consiste em síntese através da reação de neutralização entre elementos de caráter ácido e básico, contendo fosfato e cálcio. Neste método, o precursor do fosfato é adicionado lentamente, gotejando, no precursor do cálcio. É necessário o controle do pH entre 8 e 12, a temperatura é mantida ambiente ou, alternativamente, próxima à temperatura de ebulição (GARCIAS, N. C. de C. A, 2021).

Como já citado anteriormente, a porosidade do material enxertado é essencial para as melhorias do crescimento ósseo dentro da estrutura. Apesar do uso da hidroxiapatita estar sendo cada vez maior devido às suas propriedades de osteocondução, osteoindução e sua biocompatibilidade, este material apresenta poros com forma e tamanhos irregulares, nem sempre interconectados, o que diminui a eficiência do enxerto (RIBEIRO, L.F, 2021). Com o objetivo de formar os poros desejados na estrutura, diversas técnicas vêm sendo estudadas, dentre elas a utilização de materiais formadores de poros "*in-situ*". Essa técnica é baseada na adição de uma fonte de material orgânico na fase da preparação do material cerâmico, que vai ser volatilizado quando a cerâmica é levada à calcinação, gerando poros no local que estava preenchido anteriormente (SILVA, L.P.B, 2022).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

5.1.1 Solventes e Reagentes

Para as sínteses e demais procedimentos experimentais, foram utilizados os reagentes: celulose microcristalina, produzida pelo laboratório Labsynth, $\text{SO}_3\text{-Py}$, dimetilformamida (DMF), piridina, trietilamina, ácido clorídrico 27%, gelatina bovina, cloreto de bário (BaCl_2), sulfato de sódio (Na_2SO_4) e ácido tricloroacético, todos adquiridos na empresa Sigma-Aldrich. A dimetilformamida foi seca em peneiras moleculares (3 Å) por 48 horas. A água destilada foi produzida por osmose reversa na UTFPR-Londrina. A síntese da hidroxiapatita, utilizada neste trabalho, foi sintetizada a partir de reagentes como óxido de cálcio (CaO), fabricada pela Biotec Reagentes Analíticos, e fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), adquirido pela Cinética Reagentes e Soluções.

5.2 Métodos Analíticos

5.2.1 Espectroscopia por absorção no infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras foram obtidos utilizando o equipamento da Perkin ELMER®, modelo Spectrum II, acoplado com acessório de reflectância total atenuada (ATR/IV). As análises se procederam no intervalo de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

5.2.2 Espectroscopia por absorção no ultravioleta

As medidas de absorção foram conduzidas no espectrofotômetro UV-Vis Biochrom Libra S60 do laboratório de multiusuários da UTFPR (LabMult-LD), câmpus Londrina, com varredura espectral na faixa de 200 nm a 360 nm.

5.2.3 Porosimetria por intrusão de mercúrio

A porosimetria por intrusão de mercúrio foi realizada nas amostras com um penetrômetro modelo 16 para inserção do mercúrio nos poros. Dentre os parâmetros do penetrômetro utilizado, a constante de penetração utilizada foi de $22,065\text{ }\mu\text{L/pF}$, o volume do tubo capilar (stem) de $1,1900\text{ mL}$, o volume penetrado de $3,8970\text{ mL}$, a

massa penetrada de aproximadamente 60,0390 g, e a pressão máxima utilizada de 4,6800 psi.

Já os parâmetros utilizados em relação ao mercúrio introduzido foi, durante o período de baixa pressão, a pressão de evacuação de 50 μ mHg durante 5 minutos, com pressão de preenchimento de 0,52 psi, e tempo de equilíbrio de 300 segundos. Já durante o período de alta pressão, o tempo de equilíbrio foi 300 segundos.

5.3 Sulfatação da celulose

5.3.1 Método A

Foi utilizada a literatura (ARAÚJO, C. A. de, et al., 2013) para a metodologia do método A da sulfatação da celulose microcristalina. Para o preparo da amostra, foi adicionado, em um balão de 50 mL, 42 mg da celulose microcristalina e 1g de SO₃-Py. Em atmosfera de nitrogênio, foi colocado 6 mL de DMF anidra, 2 mL de piridina anidra e 0,3 mL de trietilamina anidra, conforme descrito na Tabela 1. A mistura foi colocada em agitação magnética em temperatura ambiente e sob atmosfera de nitrogênio por 23h.

Tabela 1 - Quantidade de reagentes para a obtenção da amostra no método A

Substância	Equivalente	Quantidade	MM (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Número MOL
Celulose Microcristalina	1	42 mg	162,14	-	0,000259
SO ₃ -Py	24	1 g	159,16	-	0,006280
DMF anidra	291	6 mL	73,09	0,944	0,775000
Piridina anidra	95	2 mL	79,10	0,982	0,024800
Trietilamina anidra	8	0,3 mL	101,19	0,726	0,002150

Fonte: Autoria própria (2023).

Após esse tempo, foi feita a purificação. A amostra foi colocada em um tubo Falcon, centrifugada e foi retirado o líquido. Depois de adicionar 8 mL de água, foi agitada no Vortex e depois centrifugada novamente. Posteriormente, o líquido foi descartado e o procedimento foi repetido mais 2 vezes. Após esse processo, a

amostra foi retirada em uma forma pastosa e colocada em um recipiente de polipropileno e inserida em um dessecador sob vácuo durante 24 horas.

5.3.2 Método B

O método B é uma variação do método A, com alguns ajustes para otimizar o tempo e verificar possíveis mudanças de resultados. O procedimento foi iniciado com a adição de 201,0 mg de celulose microcristalina em um balão de 50 mL e 591,5 mg de SO₃-Py. Em atmosfera de nitrogênio, foi colocado 2 mL de DMF anidra, 0,6 mL de piridina anidra e 0,1 mL de trietilamina anidra, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Quantidade de reagentes para a obtenção da amostra no método B

Substância	Equivalente	Quantidade	MM (g/mol)	Densidade (g/cm³)	Número MOL
Celulose Microcristalina	1	201 mg	162,14	-	0,001240
SO ₃ -Py	3	591,5 g	159,16	-	0,003720
DMF anidra	21	2 mL	73,09	0,944	0,025800
Piridina anidra	6	0,6 mL	79,10	0,982	0,007450
Trietilamina anidra	0,6	0,1 mL	101,19	0,726	0,000717

Fonte: Autoria própria (2023).

Após a mistura dos reagentes, a amostra foi despejada em um balão de fundo redondo de 25 mL, o qual foi colocado no aparelho de ultrassom durante 1h30. Posteriormente, o líquido foi despejado igualmente em 3 tubos Falcon e depois centrifugado durante 2 minutos. O líquido foi retirado, adicionou-se 6 mL de água em cada tubo para ser agitado no Vortex, para realizar a mistura da amostra com a água, e depois centrifugado novamente durante 2 minutos. O líquido foi descartado e o processo foi repetido mais 2 vezes. Posteriormente, a amostra, em uma forma pastosa, foi retirada dos tubos Falcon e colocada em um recipiente de polipropileno e deixada no dessecador sob vácuo durante 24 horas.

O procedimento foi realizado mais duas vezes, para obtenção de uma maior quantidade de amostra para ser utilizada posteriormente. A amostra denominada GSB-01 é feita com 2,0070 g de celulose microcristalina e 5,910 g de SO₃-Py. A

amostra GSB-02 é produzida com 2,0018 g de celulose microcristalina e 5,9125 g de $\text{SO}_3\text{-Py}$. Foi utilizado 20 mL de DMF anidra, 6 mL de piridina anidra e 1 mL trietilamina.

5.4 Quantificação do grau de sulfatação

Para a quantificação do grau de sulfatação, foi utilizada um método colorimétrico baseado em trabalho já previamente publicado (LOPES, J. L., 2019). Foram preparadas 4 soluções: HCl 1M, solução gelatina-bário, Na_2SO_4 e ácido tricloroacético.

Para a preparação de 10 mL da solução de HCl 1 mol/L, foi adicionado, aproximadamente, 5 mL de água destilada em um béquer de 10 mL, e, em seguida, 0,826 mL de HCl (12 mol/L). Posteriormente, essa solução foi vertida em balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água destilada.

Foi preparada 10 mL de solução gelatina-bário 5 mg/mL, através da adição de 50 mg de gelatina em um béquer e, aproximadamente, 5 mL de água destilada. Depois, foi adicionado 50 mg de BaCl_2 e descartado em um balão volumétrico de 10 mL, o volume foi completado com água destilada. A solução foi armazenada durante 4 dias e depois foi colocada durante 10 minutos no ultrassom.

A preparação de 5 mL de Na_2SO_4 foi feita através da adição de, aproximadamente, 3 mL da solução de HCl 1 mol/L em um béquer contendo 25 mg de Na_2SO_4 (anidro). Após a dissolução, foi vertido em um balão volumétrico de 5 mL e o volume completado com a solução de HCl 1 mol/L.

Para a preparação de 100 mL da solução de ácido tricloroacético 3% (m/v), foi adicionado, aproximadamente, 30 mL de água destilada em um béquer e 2,98 g de ácido tricloroacético, lentamente. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água destilada.

Para a curva analítica foram preparadas cinco soluções de 5 mL, de quantidades de sulfato variadas e conhecidas (contendo 20-200 mg/mL de SO_4^{2-}), contendo 3,8 mL de TCA, 1 mL de solução gelatina-bário e volume variado de solução HCl 1M, conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Concentrações de 5 soluções para a curva padrão

Solução	Sol. TCA 3% (mL)	Sol. Gel-Bário (mL)	Sol. HCl 1 mol/L (mL)	Sol. Na ₂ SO ₄ (mL)	[] Na ₂ SO ₄ (µg/mL)	[] SO ₄ (µg/mL)
1	3,8	1	0	0,20	200	135,2295
2	3,8	1	0,05	0,15	150	101,4221
3	3,8	1	0,10	0,10	100	67,6148
4	3,8	1	0,15	0,05	50	33,8074
5	3,8	1	0,18	0,02	20	13,5300

Fonte: Autoria própria (2023).

As soluções de concentrações conhecidas foram lidas em espectrofotômetro UV-Vis a 360 nm, onde a água destilada foi usada como branco, de forma a verificar o pico da absorvância.

5.4.1 Hidrólise da amostra sulfatada

Com a utilização das soluções apresentadas no tópico 5.4, foi feita uma hidrólise da amostra sulfatada. Para isso, foi pesado uma massa de 3,4 mg da amostra sulfatada, a qual foi submetida à hidrólise com 1 mL de HCl 1M durante 5 horas em banho de óleo a 110°C. A preparação para leitura UV-Vis foi feita pipetando uma alíquota da mistura e adicionando as demais soluções, mesma quantidade apresentada na Tabela 4. Depois disso, a amostra foi lida em espectrofotômetro UV-Vis a 360 nm.

Tabela 4 - Preparação da solução para leitura UV-Vis

Solução	Sol. TCA 3% (mL)	Sol. Gel-Bário (mL)	Sol. HCl 1 mol/L (mL)	Volume pipetado reação hidrólise (mL)
1	3,8	1	0	0,20

Fonte: Autoria própria (2023).

Com base na concentração encontrada nesta solução, foi quantificada (em massa) os íons sulfatos presentes na solução de hidrólise e determinado o grau de substituição de acordo com a Equação 1:

$$DS = \frac{\frac{M1}{96}}{\frac{M2 - \left(\frac{M1}{96} * 80\right)}{161}} \quad (1)$$

Onde:

M1 = a massa de íons sulfatado presente na solução de hidrólise, em gramas;

M2 = a massa do material de celulose sulfatado submetido a hidrólise, em gramas.

5.5 Síntese da hidroxiapatita

A amostra de hidroxiapatita, HAP-P, foi obtida utilizando uma razão Ca/P de 1,67. Primeiramente, em um béquer, pesou-se 2,79 g de CaO e foi diluído em 200 mL de água destilada com o auxílio de um agitador magnético. Em outro béquer, foi pesado 4,06 g de KH₂PO₄ e diluiu-se em 10 mL de água destilada.

A solução de KH₂PO₄ foi gotejada à solução de CaO lentamente com a ajuda de uma bureta, controlando o pH na faixa acima de 10. Depois da completa reação entre os precursores, foi desligada a agitação e o material foi colocado na estufa.

A amostra passou pelo processo de sinterização em forno Nabertherm LHT 02/17 Speed. A rampa de aquecimento consistiu na taxa de 1°C por minuto até atingir 800°C, depois uma taxa de 5°C até 1100°C, depois permaneceu por 1 hora nesta temperatura. Obtendo-se a amostra de hidroxiapatita cristalina, HAP-S.

5.6 Síntese da hidroxiapatita sobre o polissacarídeo sulfatado

A primeira amostra, GSB-01-P, foi preparada com uma proporção de hidroxiapatita em relação ao polissacarídeo sulfatado igual a 1:0,4, respectivamente. O procedimento iniciou-se com a diluição, em um béquer de 150 mL, de 1,6625 g de CaO e 1,2045 g de celulose microcristalina sulfatada em 100 mL de água. Foi feita a diluição de 2,4427 de KH₂PO₄ em 100 mL de água em outro béquer de 150 mL. Com a ajuda de uma bureta, a solução contendo o fosfato de potássio monobásico foi gotejada à solução de óxido de cálcio com celulose sob agitação magnética, controlando o pH acima de 10. Após a completa reação entre os precursores, a agitação foi desligada e a amostra foi decantada durante 24 horas. Feita decantação total, foi realizada a filtração do material durante 24 horas e depois foi levado até a estufa por 24 horas a 60°C para a completa secagem do material. Depois de seco, o

material foi levado para ser analisado no infravermelho e no MEV, antes da sinterização.

Em conjunto, foi preparada a segunda amostra, GSB-02-P, com uma proporção de hidroxiapatita em relação ao polissacarídeo sulfatado igual a 1:0,8, respectivamente. O procedimento começa com a diluição de 1,6732 g de CaO e 2,4085 g de celulose microcristalina sulfatada em 100 mL de água em um béquer de 150 mL. Em outro béquer de 150 mL, foi feita a diluição de 2,4477 g de KH_2PO_4 em 100 mL de água. Foi despejado a solução contendo o fosfato de potássio monobásico em uma bureta, a qual foi gotejada sobre a solução de óxido de cálcio e celulose microcristalina sulfatada, sob agitação magnética. Após o desligamento da agitação, a amostra foi decantada durante 24 horas. Posteriormente, com a decantação total, foi feita a filtração com um papel filtro durante 24 horas e depois foi deixado na estufa a 60°C por 24 horas. Depois de seco, o material foi levado para ser analisado no infravermelho e no MEV, antes da sinterização.

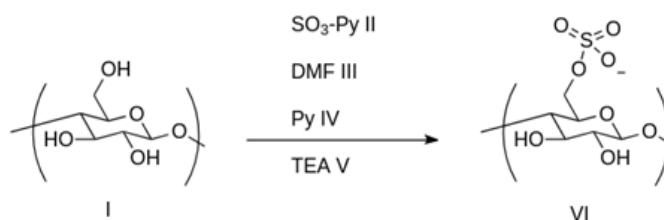
As amostras GSB-01-P e GSB-02-P passaram pelo processo de sinterização em forno Nabertherm LHT 02/17 Speed. A rampa de aquecimento consistiu na taxa de 1°C por minuto até atingir 800°C, depois uma taxa de 5°C até 1100°C, depois permaneceu por 1 hora nesta temperatura. Obtendo as amostras GSB-01-S e GSB-02-S, respectivamente.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Formação da celulose microcristalina sulfatada

Para a formação de um material de melhor qualidade, aumentando a interação entre o material polimérico e a hidroxiapatita, foi feita a sulfatação da celulose microcristalina, como forma de criação de cargas negativas na sua estrutura molecular, Figura 3, auxiliando na nucleação durante a deposição da HAP. A formação do polissacarídeo sulfatado foi possível através da reação entre o reagente complexo de trióxido de enxofre-piridina e as hidroxilas presentes na celulose, assim introduzindo o grupo sulfato com a carga negativa desejada.

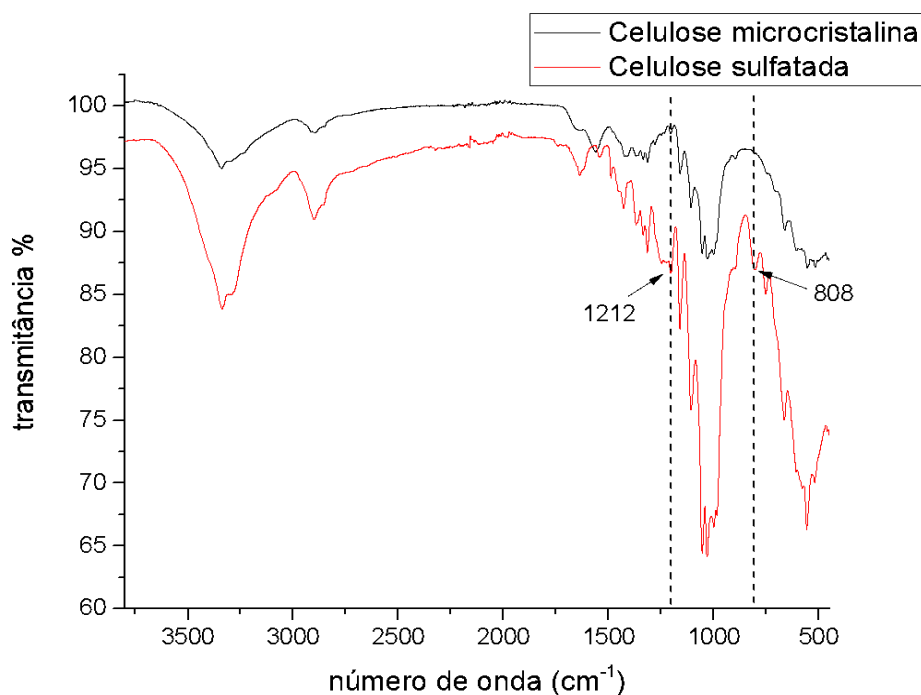
Figura 3 - Polissacarídeo Sulfatado



Fonte: Autoria própria (2023).

A reação de substituição nucleofílica da hidroxila pelo grupo sulfato foi confirmado pela análise de espectroscopia no infravermelho, comparando a celulose microcristalina antes e depois da sulfatação, como mostrado na Gráfico 1. Observou-se uma banda intensa em 1212 cm⁻¹, atribuída à vibração assimétrica de estiramento S=O, e em 808 cm⁻¹ foi observada a banda de vibração simétrica de estiramento C-O-S, indicando a presença do grupo sulfato na estrutura da celulose microcristalina. Além disso, foi possível analisar as bandas O-H na faixa de 3000 cm⁻¹ a 3500 cm⁻¹ e C-O na região de 1000 cm⁻¹ a 1200 cm⁻¹.

Gráfico 1 - Espectro no infravermelho da celulose microcristalina e da sulfatada



Fonte: Autoria própria (2023).

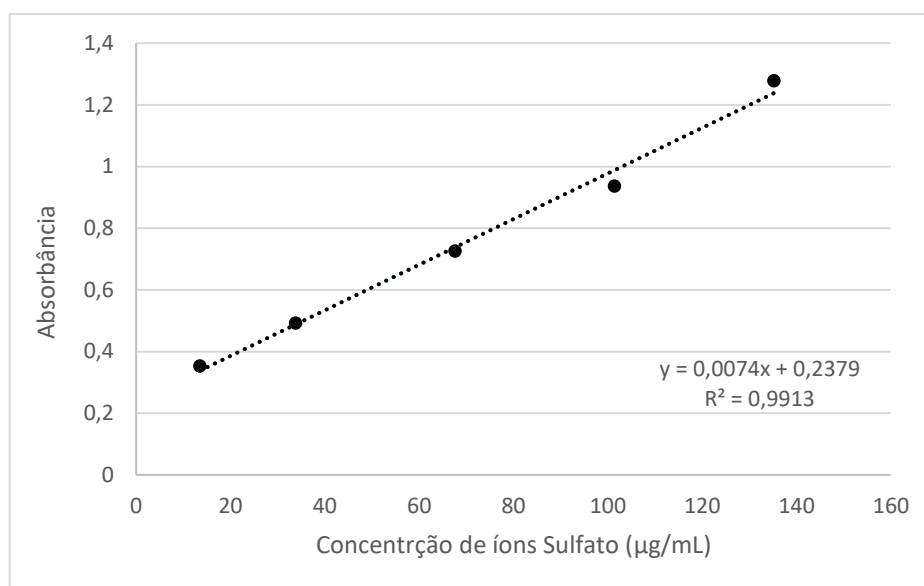
6.2 Determinação do grau de substituição

A quantificação foi calculada através dos resultados da absorvância das soluções do tópico 5.4, as quais foram lidas no UV-Vis, sendo feita uma curva de calibração. Os resultados estão contidos na Tabela 5 e a curva de calibração é demonstrada no Gráfico 2, cuja equação é $y = 0,0074x + 0,2379$ e linearidade $R^2 = 0,9913$.

Tabela 5 – Relação entre a solução e a sua absorvância obtida no UV-Vis

Solução	Absorvância	[] íons Sulfato ($\mu\text{g/mL}$)
1	1,279	135,2295
2	0,937	101,4221
3	0,727	67,6148
4	0,493	33,8074
5	0,354	13,5300

Fonte: Autoria própria (2023).

Gráfico 2 - Curva padrão obtido através dos resultados do UV-Vis

Fonte: Autoria própria (2023).

Os resultados da absorbância da amostra sulfatada, procedimento contido no tópico 5.4.1, foi de 0,640. Considerando a curva de calibração, encontrou-se um valor de 54,33 µg/mL, que significa uma quantidade de íons sulfato hidrolisados do material celulósico igual a 1357 µg. Sabendo que foi utilizado 3,4 mg do material celulósico, se aplicou a fórmula do grau de substituição e se obteve um valor de DS igual a 1. Este valor significa que, em média, cada unidade de glicose apresenta uma hidroxila substituída por um grupo sulfato.

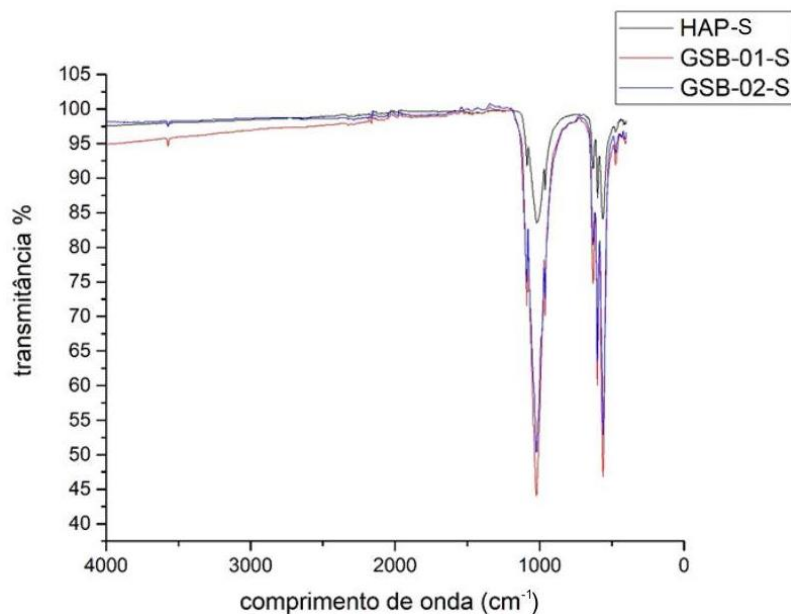
Além disso, observou-se que a amostra submetida ao ultrassom apresentou bons resultados, de acordo com a quantificação. Essa técnica é eficiente quando é trabalhada com sistemas heterogêneos devido aos choques crescentes de solvente/reagente na superfície. Logo, constatou essa eficiência no tempo de reação para obter o polissacarídeo sulfatado.

6.3 Espectroscopia no infravermelho das amostras sinterizadas

A espectroscopia no infravermelho nas amostras HAP-S, GSB-01-S e GSB-02-S foi aplicada para analisar os grupos funcionais presentes nos materiais e comparar os resultados obtidos, afim também de comprovar a expulsão do material de sacrifício, polissacarídeo sulfatado, depois da sinterização.

O Gráfico 3 apresenta as bandas que caracterizam o composto hidroxiapatita e são atribuídas, principalmente, aos grupamentos PO_4 em torno de 1087 e 962 cm^{-1} , e OH^- próximas a 628 cm^{-1} .

Gráfico 3 - Espectro no infravermelho das amostras sinterizadas



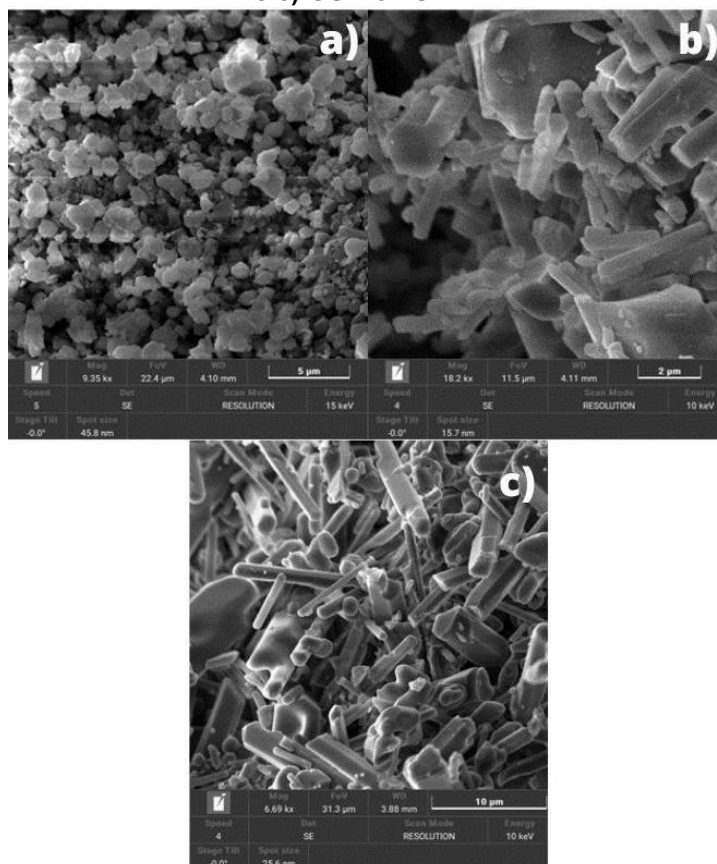
Fonte: Autoria própria (2023).

Os resultados das três amostras são semelhantes, o que comprova que não há materiais diferentes de hidroxiapatita, confirmando a expulsão do polissacarídeo sulfatado que foi inserido nas amostras GSB-01-S e GSB-02-S. Além disso, a ausência das bandas típicas de celulose, expressadas no Gráfico 1, comprovam que não há mais outro material além da hidroxiapatita.

6.4 Imagens do MEV das amostras sinterizadas

As amostras HAP-S, GSB-01-S e GSB-02-S foram analisadas no MEV para avaliação do padrão de morfologia dos grãos presentes. A Figura 4a mostra os resultados obtidos da amostra da hidroxiapatita pura sinterizada e nas Figuras 4b e 4c estão contidos os resultados da análise por microscopia eletrônica de varredura das amostras GSB-01-S e GSB-02-S, respectivamente.

Figura 4 - Resultados obtidos por microscopia eletrônica de varredura: a) HAP-S; b) GSB-01-S e c) GSB-02-S



Fonte: Autoria própria (2023).

É possível observar que houve alterações na morfologia dos materiais a base de hidroxiapatita que continham celulose anterior ao processo de sinterização. No caso da HAP-S, têm-se grãos mais definidos, enquanto os grãos das amostras modificadas pelo material gerador de poros estão com os grãos em formas de bastonetes. Especula-se que essa mudança de morfologia tenha origem na forma como os cristais de HAP se formaram durante sua síntese na presença do polímero sulfatado. Entende-se que as cargas negativas presentes no polissacarídeo podem nuclear a síntese de HAP numa topologia diferente do grupo controle.

6.5 Porosimetria por intrusão de mercúrio

As amostras HAP-S, GSB-01-S e GSB-02-S foram levadas para a análise de porosimetria por intrusão de mercúrio para caracterizar as estruturas porosas dos materiais sinterizados. Os resultados da pressão aplicada (psi), do diâmetro de poro (μm) e do volume incremental de poro (mL/g) das amostras estão constadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados obtidos na porosimetria por intrusão de mercúrio para HAP-S, GSB-01-S e GSB-02-S

HAP-S			GSB-01-S			GSB-02-S		
Pressão (psi)	Diâmetro do poro (µm)	Volume incremental de poro (mL/g)	Pressão (psi)	Diâmetro do poro (µm)	Volume incremental de poro (mL/g)	Pressão (psi)	Diâmetro do poro (µm)	Volume incremental de poro (mL/g)
0,54	337,5978	0,0000	0,54	337,0821	0,0000	0,54	337,3046	0,0000
1,01	179,2355	0,0090	1,01	179,5194	0,0093	1,01	177,3578	0,0425
2,01	90,0842	0,0048	2,01	90,0125	0,0066	2,02	89,6109	0,0154
4,00	45,1729	0,0019	4,00	45,2407	0,0041	4,02	45,0228	0,0077
7,99	22,6422	0,0014	7,98	22,6506	0,0041	7,99	22,6307	0,0071
15,95	11,3382	0,0013	15,96	11,3355	0,0052	16,02	11,2930	0,0074
30,01	6,0273	0,0011	29,95	6,0382	0,0066	30,01	6,0276	0,0175
58,47	3,0932	0,0001	58,57	3,0881	0,0045	58,45	3,0945	0,1298
98,37	1,8386	0,0000	98,33	1,8393	0,0137	99,57	1,8164	0,2310
129,32	1,3986	0,0000	128,49	1,4076	0,0374	128,36	1,4091	0,0970
169,23	1,0688	0,0000	168,73	1,0719	0,1995	168,73	1,0719	0,0791
218,25	0,8287	0,0000	217,52	0,8315	0,2039	217,71	0,8308	0,0400
282,99	0,6391	0,0000	283,25	0,6385	0,1211	282,97	0,6392	0,0180
369,76	0,4891	0,0000	368,90	0,4903	0,0266	369,15	0,4899	0,0088
479,59	0,3771	0,0000	480,46	0,3764	0,0061	480,99	0,3760	0,0038
626,67	0,2886	0,0077	627,05	0,2884	0,0021	626,74	0,2886	0,0020
813,44	0,2223	0,0270	813,12	0,2224	0,0011	812,99	0,2225	0,0005
1058,87	0,1708	0,0230	1057,48	0,171	0,0004	1057,36	0,1711	0,0006
1376,52	0,1314	0,0029	1376,08	0,1314	0,0003	1376,41	0,1314	0,0003
1790,23	0,1010	0,0002				1789,58	0,1011	0,0001
2327,96	0,0777	0,0000				2327,61	0,0777	0,0000
3026,91	0,0598	0,0000						
3934,44	0,0460	0,0000						

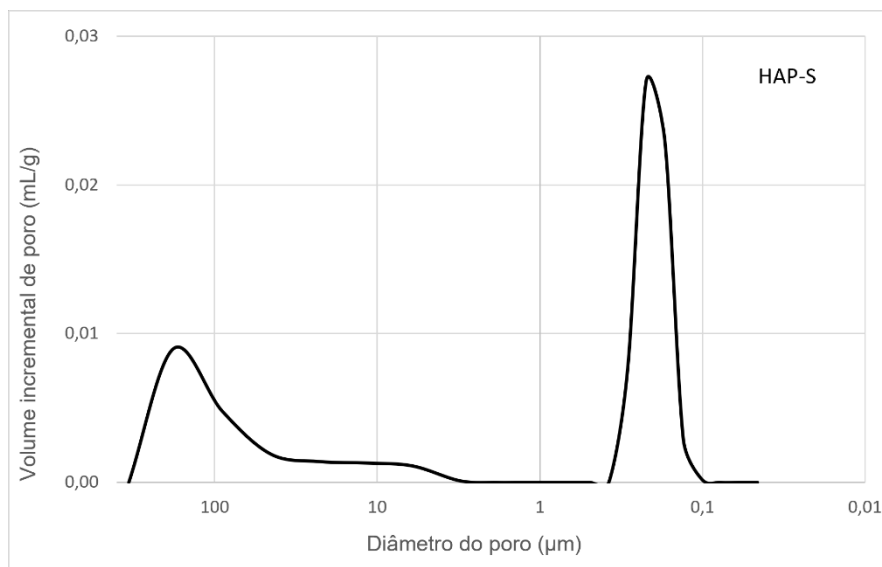
Fonte: Autoria própria (2023).

Analisando os dados da Tabela 7, é possível inferir que a HAP-S possui valores absolutos de diâmetro de poro menores em comparação às duas outras amostras, isso pode ser concluído também por necessitar de uma maior pressão para que o mercúrio seja completamente intruído nos poros do material.

No Gráfico 4, referente aos dados obtidos da HAP-S, pode-se verificar que a maior quantidade de mercúrio inserido no material está na região de poros de diâmetro 0,2223 µm, obtidos com uma pressão de 813,44 psi. Além de apresentar uma

porcentagem com um tamanho de poro de 179,2355 μm . Ou seja, foi verificado que existem poros com grandes diferenças de tamanhos na morfologia.

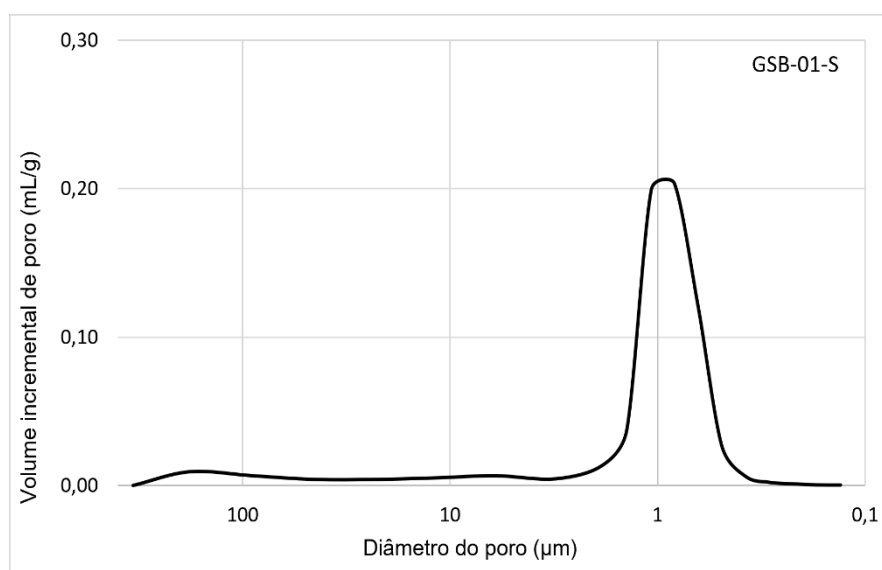
Gráfico 4 - Volume incremental de poro x diâmetro do poro para a HAP-S



Fonte: Autoria Própria (2023).

Os resultados da amostra GSB-01-S estão contidos no Gráfico 5, no qual é possível observar que a maior concentração de volume incremental está contida no tamanho de poro de 0,8315 μm , apresentando uma menor distribuição de tamanhos de poros, concentrando em apenas uma região.

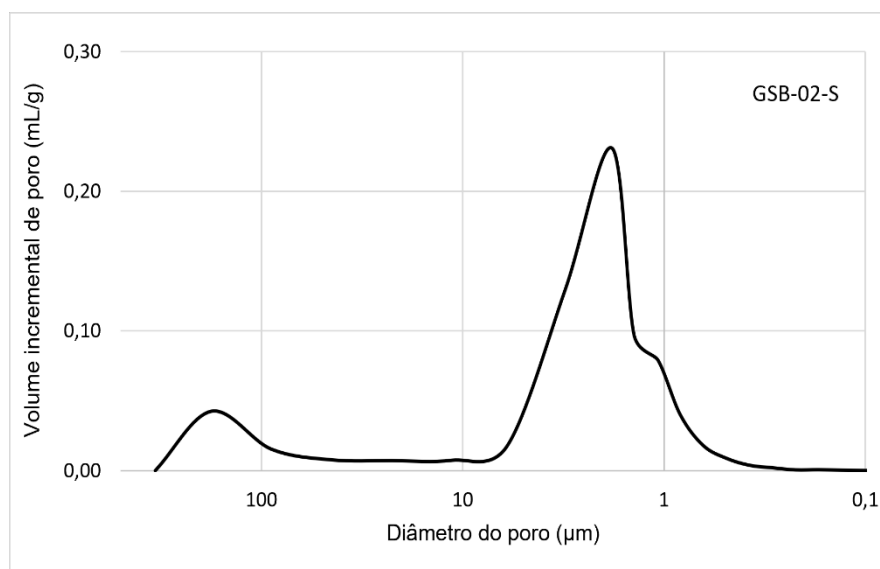
Gráfico 5 - Volume incremental de poro x diâmetro do poro para GSB-01-S



Fonte: Autoria Própria (2023).

Assim como a amostra GSB-01-S, a GSB-02-S apresenta uma menor distribuição de tamanhos de poros, concentrando uma maior porcentagem em um diâmetro de 1,8164 μm , apesar de conter uma pequena porcentagem em 177,3578 μm , como mostrado no Gráfico 6.

Gráfico 6 - Volume incremental de poro x diâmetro do poro para GSB-02-S



Fonte: Autoria Própria (2023).

As amostras que continham a celulose sulfatada apresentaram um perfil de poros mais homogêneo, especialmente a amostra GSB-01-S, e na maior população dos poros de cada amostra, houve um aumento de aproximadamente 8 e 3,7 vezes para GSB-01-S e GSB-02-S, respectivamente, em relação à hidroxiapatita pura. Portanto, entende-se que a utilização do polissacarídeo sulfatado influenciou nos diâmetros dos poros e na sua distribuição de tamanho na morfologia dos materiais.

7 CONCLUSÃO

O polissacarídeo foi sulfatado com sucesso, confirmado através dos resultados apresentados na espectroscopia no infravermelho, indicando a inserção do grupo sulfatado, obtendo-se as cargas negativas desejadas. Além disso, a reação de modificação sob irradiação no ultrassom apresentou um grau de substituição igual a 1, apresentando uma melhora nas condições de reação em comparação método clássico.

Além disso, a realização da sinterização após a inclusão do polissacarídeo sulfatado apresentou poros com diâmetros maiores na maior proporção. Os resultados da porosimetria por intrusão de mercúrio também indicaram uma menor distribuição entre os diâmetros de poros, sendo mais homogêneos.

As análises de MEV indicaram também uma significativa diferença entre os materiais estudados, confirmando uma mudança na morfologia.

A união entre o polissacarídeo sulfatado e a hidroxiapatita durante a sintetização forneceram indicadores de resultados em uma direção desejada, ou seja, aumento de tamanho de poro e sua distribuição populacional. A amostra com uma maior proporção de polissacarídeo, GSB-02-S, apresentou um material com um volume máximo incremental em um diâmetro maior, mas ainda não foi possível chegar no resultado esperado que tinha como objetivo de poros com diâmetro, no mínimo, 50 μm , para serem utilizados em enxertos ósseos. Ainda assim, esta metodologia poderá ser adaptada para investigação no futuro na busca por poros de tamanhos mais adequados.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, C. A. de, et al. **Selective sulfation carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties**. Carbohydrate Polymers, 91, pp. 483-491, 2013.
- FREITAS, L.A. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita porosa com propriedades osteoativas**, Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2020.
- GARCIAS, N. C. de C. A. **Síntese por via úmida de hidroxiapatita a partir de casca de ovo (Gallus Gallus domesticus) e sua caracterização microestrutural**. Dissertação Mestrado – Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2021.
- GOMES, D. S., et al. **A brief review on hydroxyapatite production and use in biomedicine**. Cerâmica 65, pp. 282-302, 2019.
- HIGASHI, S., et al. **Polymer-hydroxyapatite composites for biodegradable bone fillers**. Biomaterials. v. 7(3), pp. 183-187, 1986.
- KAWACHI, E. Y., et al. **Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar**. Química Nova, 23(4), 2000.
- KUTIKOV, A. B., SONG, J. **An amphiphilic degradable Polymer/hydroxyapatite composite with enhanced handling characteristics promotes osteogenic gene expression. In bone marrow stromal cells**. Acta Biomater, 9(9), pp. 8354-8364, 2013.
- LE, H; NATESAN, K; PRANTI-HARAN, S. **Mechanical property and biocompatibility of co-precipitated nano hydroxyapatite-gelatine composites**. Journal of Advanced Ceramics 4(3), pp. 237-243, 2015.
- MORAES, K.K., et al. **Avaliação das propriedades mecânicas de compósitos de matriz cimentícia com microcelulose cristalina**. Revista Matéria – Curso de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.
- OLIVEIRA, M.M. de. **Nanostructure variability of cellulose from plants and the impact on cellulose nanocrystals production**. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2018.
- ORLOVSKII, V.P.; KOMLEV, V.S.; BARINOV, S. M.M. **Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramic**. Inorganic Materials, Vol. 38, No. 10, 2002, pp. 973-984.
- RIBEIRO, L.F. **Desenvolvimento de biomateriais poroso para liberação de ativos**. Relatório de conclusão de pesquisa – Curso de Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2021.
- SADAT-SHOJAI, M., et al. **Synthesis methods for nanosizes hydroxyapatite with diverse structures**. Acta Biomaterialia. Vol. 9 (8), pp. 7591-7621, 2013.

SCOMBATTI, S. L. ImplantNewsPerio. **Substitutos ósseos em Implantodontia – conceitos biológicos.** Fev. 2020. Disponível em: <https://implantnewsperio.com.br/substitutos-osseos-em-implantodontia-conceitos-biologicos/>. Acesso em: 03 nov. 2022.

SEPÚLVEDA, S., et al. **Hidroxiapatita porosa produzida através do gelcasting de espumas visando aplicações biomédicas.** Cerâmica 45(296), 1999.

SILVA, L.P.B. **Desenvolvimento de biomateriais porosos acoplados a sistemas carreadores: ácido zoledrônico encapsulado em lipossomas.** Dissertação – Curso de Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2022.

SILVEIRA, E da. Revista Pesquisa FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). **Enxerto Sintético: Novas técnicas e biomateriais facilitam a produção de peças para substituição de ossos humanos.** Jan. 2015. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/enxerto-sintetico/>. Acesso em: 03 nov. 2022.

SODRÉ, M.A., et al. **Caracterização de celulose microcristalina de uso intranasal.** Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2012.

TRACHE, D., et al. **Microcrystalline cellulose: Isolation characterization and bio-composites application – A review.** International Journal of Biological Macromolecules. Vol. 93, Part A, p. 789-804, 2016.