

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE
MATERIAIS - PPGCEM
MESTRADO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

LARA VASCONCELLOS PONSONI

CRIOGÉIS DE CELULOSE FUNCIONALIZADOS POR ORGANOSILANOS PARA
CULTIVO DE CÉLULAS EM MATRIZ EXTRACELULAR

CRICIÚMA
2025

LARA VASCONCELLOS PONSONI

**CRIOGÉIS DE CELULOSE FUNCIONALIZADOS POR ORGANOSILANOS PARA
CULTIVO DE CÉLULAS EM MATRIZ EXTRACELULAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais
da Universidade do Extremo Sul Catarinense -
UNESC

Orientador: Prof. Dr. Matheus Vinicius Gregory
Zimmermann
Coorientadora: Prof. Dr^a. Sabrina Arcaro

CRICIÚMA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P799c Ponsoni, Lara Vasconcellos.

Criogéis de celulose funcionalizados por organossilanos para cultivo de células em matriz extracelular / Lara Vasconcellos Ponsoni. - 2025.
65 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Criciúma, 2025.
Orientação: Matheus Vinicius Gregory Zimmermann.
Coorientação: Sabrina Arcaro.

1. Materiais biocompatíveis. 2. Celulose. 3. Criogel. 4. Silanos. 5. Técnicas de cultura de células em três dimensões. 6. Alicerces teciduais. 7. Crescimento celular. 8. Proliferação de células. 9. Engenharia tecidual. I. Título.

CDD 23. ed. 610.28

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

Lara Vasconcellos Ponsoni

Criogéis de celulose funcionalizados por organosilanos para cultivo de células em matriz extracelular.

Esta Dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre(a) em Ciência e Engenharia de Materiais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais - PPGCEM (Área de concentração: Tecnologia de Materiais) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Criciúma, SC, 11 de fevereiro de 2025.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Elídio Angioletto
Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC

Documento assinado digitalmente
ELIDIO ANGIOLETTO
Data: 17/02/2025 17:05:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Alexandra Ioppi Zugno
Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC

Documento assinado digitalmente
ALEXANDRA IOPPI ZUGNO
Data: 17/02/2025 15:37:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Beatriz Merillas Valero
University of Burgos, Faculty of Science

**MERILLAS
VALERO BEATRIZ -
12343057S**

Firmado digitalmente por
MERILLAS VALERO BEATRIZ -
12343057S
Fecha: 2025.02.17 17:49:40
+01'00'

Dedico esse trabalho aos meus mentores, família, amigos e a todos aqueles que de alguma forma me incentivaram a tornar esse trabalho uma realidade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marcos e Giana por todo o apoio e incentivo aos estudos que sempre tive, pelos dias sofrendo juntos com cada desafio e celebrando cada sucesso. Ao meu irmão Dimitri por sempre acreditar em mim e me trazer palavras de incentivo nos momentos certos.

Aos meus orientadores Prof^o Matheus e Prof^a Sabrina, pela oportunidade, por todo o apoio, confiança e paciência em cada uma das etapas.

Ao grupo de pesquisa CEPOL, em especial a Marina, pelos auxílios no desenvolvimento do trabalho e a parceria diária no laboratório. Ao grupo de pesquisa CERTEC por me acolher e auxiliar sempre quando necessário.

Aos meus amigos que sempre me incentivaram, acreditaram em mim, me acolheram e abraçaram quando precisei em especial ao Guilherme. E a Laíse e a Gabriela, crescer junto com vocês foi e têm sido um grande privilégio.

Aos membros da banca pela disposição de ler, corrigir e discutir essa dissertação.

A CAPES pelo apoio financeiro, e ao PPGCEM e a Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) pelo suporte e estruturas fornecidas.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFGRS), em especial a Natasha, pela disponibilização de seus laboratórios para realização de ensaios.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram diretamente ou indiretamente na produção deste trabalho.

RESUMO

Os *scaffolds* tridimensionais porosos desempenham um papel importante no suporte e crescimento tecidual, sendo amplamente empregados na cultura celular tridimensional (3D) em matriz extracelular (ECM). Esta abordagem representa um avanço significativo na área biomédica, permitindo a substituição de culturas celulares tradicionais em duas dimensões (2D) e reduzindo a necessidade de testes em animais, que apresentam limitações fisiológicas, metabólicas e custos elevados. Entre os materiais promissores para o desenvolvimento de *scaffolds*, destaca-se a celulose, um biopolímero renovável e biocompatível, cujas propriedades estruturais podem ser ajustadas por diferentes processos de secagem e modificações químicas. Apesar dos avanços na utilização de aerogéis e criogéis de celulose como biomateriais, a influência de diferentes organossilanos na funcionalização dessas estruturas ainda é pouco explorada, especialmente quanto à adesão e proliferação celular. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar *scaffolds* baseados em criogéis de celulose microfibrilada, obtidos por liofilização e funcionalizados por deposição a vapor com diferentes organossilanos: tetraetoxissilano (TEOS), trietoxivinilsilano (TEVS), 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES) e 3-glicidiloxipropiltrimetoxissilano (GPTMS). A caracterização dos criogéis foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise de porosidade, densidade aparente, molhabilidade por ângulo de contato e ensaios de adesão e citotoxicidade celular. Os resultados indicaram que os criogéis apresentaram porosidade elevada (98-99%) e densidade aparente entre 0,0156-0,0240 g/cm³. Os criogéis silanizados com TEVS e APTES exibiram maior hidrofobicidade (ângulo de contato entre 85-103°), dificultando a adesão celular e tornando-os inadequados para aplicação como *scaffolds*. Por outro lado, os criogéis tratados com TEOS e GPTMS apresentaram melhor adesão e viabilidade celular nos ensaios com fibroblastos MRC-5 e células neurais PC-12, tornando-se candidatos promissores para aplicações em cultura celular 3D. Os resultados deste estudo demonstram que a funcionalização de criogéis de celulose com TEOS e GPTMS favorece a adesão e proliferação celular, consolidando esses materiais como potenciais *scaffolds* para engenharia tecidual. Tais resultados contribuem para o avanço na substituição de modelos 2D e ensaios in vivo, promovendo o desenvolvimento de sistemas biomiméticos mais eficazes para aplicações biomédicas.

Palavras-chave: Celulose; Silanos; Criogel; Cultura celular 3D; *Scaffolds*; Crescimento e proliferação celular.

ABSTRACT

Three-dimensional porous scaffolds play an important role in tissue support and growth and are widely used in three-dimensional (3D) cell culture within the extracellular matrix (ECM). This approach represents a significant advancement in the biomedical field, enabling the replacement of traditional two-dimensional (2D) cell cultures and reducing the need for animal testing, which presents physiological, metabolic, and high-cost limitations. Among the promising materials for scaffold development, cellulose stands out as a renewable and biocompatible biopolymer whose structural properties can be adjusted through different drying processes and chemical modifications. Despite advances in the use of cellulose aerogels and cryogels as biomaterials, the influence of different organosilanes in the functionalization of these structures remains underexplored, particularly regarding cell adhesion and proliferation. In this context, this study aimed to develop and characterize scaffolds based on microfibrillated cellulose cryogels obtained through freeze-drying and functionalized via vapor deposition with different organosilanes: tetraethoxysilane (TEOS), triethoxyvinylsilane (TEVS), 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES), and 3-glycidyloxypropyltrimethoxysilane (GPTMS). The cryogels were characterized using scanning electron microscopy (SEM), porosity analysis, apparent density, contact angle wettability, and cell adhesion and cytotoxicity assays. The results indicated that the cryogels exhibited high porosity (98-99%) and apparent density ranging from 0.0156 to 0.0240 g/cm³. Cryogels silanized with TEVS and APTES showed higher hydrophobicity (contact angle between 85-103°), hindering cell adhesion and making them unsuitable for scaffold applications. In contrast, cryogels treated with TEOS and GPTMS demonstrated better adhesion and cell viability in assays with MRC-5 fibroblasts and PC-12 neural cells, making them promising candidates for 3D cell culture applications. The results of this study demonstrate that functionalizing cellulose cryogels with TEOS and GPTMS enhances cell adhesion and proliferation, establishing these materials as potential scaffolds for tissue engineering. These findings contribute to advancing the replacement of 2D models and in vivo assays, promoting the development of more effective biomimetic systems for biomedical applications.

Keywords: Cellulose; Silanes; Cryogel; 3D Cell Culture; Scaffolds; Cell Growth and Proliferation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Comparação entre cultura celular 2D vs 3D.....	11
Figura 2 - Esquema do procedimento da engenharia tecidual com scaffold.....	13
Figura 3 - Representação do monômero da celulose.....	15
Figura 4 - Criogel de celulose sobre flores.....	17
Figura 5 - Representação da metodologia de secagem do aerogel por extração supercrítica. .	19
Figura 6 - Método de secagem do xerogel.....	20
Figura 7 - Método de secagem de criogel por liofilização.....	21
Figura 8 - Aplicações de aerogéis no campo biomédico.....	24
Figura 9 - Etapas para obtenção da celulose microfibrilada.....	26
Figura 10 - Principais etapas da metodologia para obtenção dos criogéis.....	27
Figura 11 - Difratogramas obtidos por DRX da (a) celulose e da (b) celulose microfibrilada	37
Figura 12 - Suspensão de celulose observada em MO em a) e b) para dois pontos diferentes	37
Figura 13 - Amostras de criogéis.....	38
Figura 144 - Esquema de classificação de tamanho de poros de Mays, (2007) e o esquema usado pela IUPAC (1972).....	40
Figura 156 - Micrografias dos criogéis de celulose com resolução de a) 500 µm; b) 100 µm; c) 20 µm e d) 10 µm.....	42
Figura 16 - Gráfico de termogravimetria com as curvas a) TG e b) DTG dos criogéis.....	43
Figura 17 - Gráfico contendo as curvas de transmitância obtidas.....	44
Figura 18 - Espectros de FTIR dos reagentes à base de organosilanos utilizados no processo de deposição a vapor.....	45
Figura 19 - Esquema de classificação de hidrofobicidade conforme o ângulo de contato.....	47
Figura 20 - Variação da massa (%) dos criogéis degradados em SBF.....	48
Figura 21 - Efeito das amostras de Cel _{GPTMS} ; Cel _{APTES} ; Cel _{TEVS} e Cel _{TEOS} sobre a viabilidade celular de células imortalizadas de fibroblastos murinos (NiH3T3) após 24 horas de exposição.....	49
Figura 22 - Efeito das amostras de Cel _{GPTMS} ; Cel _{APTES} ; Cel _{TEVS} e Cel _{TEOS} sobre a viabilidade celular de células imortalizadas de fibroblastos murinos (NiH3T3) após 48 horas de exposição.....	50
Figura 23 - Efeito das amostras de Cel _{GPTMS} ; Cel _{APTES} ; Cel _{TEVS} e Cel _{TEOS} sobre a viabilidade celular de células imortalizadas de fibroblastos murinos (NiH3T3) após 72 horas de exposição.....	51
Figura 24 - Imagens de microscopia de fluorescência para as células MRC-5.....	52
Figura 25 - Viabilidade celular medida por absorbância com células de MRC-5.....	53
Figura 26 - Imagens de microscopia de fluorescência para as células PC-12.....	54
Figura 27 - Viabilidade celular de células PC-12 após 24 horas de exposição.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grau de polimerização das fibras de celulose antes e após a moagem mecânica ...	36
Tabela 2 - Densidade aparente e porosidade das amostras.....	39
Tabela 3 - Molhabilidade por ângulo de contato das amostras	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Scaffold - Andaime (estrutura)

TEOS - Tetraetoxisilano

TEVS - Trietoxivinilsilano

APTES - 3-aminopropiltriethoxisilano

GPTMS - 3-glicidiloxipropiltrimetoxisilano

Ø – Diâmetro

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (tampão fosfato salino)

FDA - Fluoresceína diacetato

IP - Iodeto de propídio

DAPI - Dicloridrato de 4',6-diamidina-2'-fenilindol

DMSO - Dimetilsulfóxido

ECM - *Extracellular matrix* (Matriz extracelular)

FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier)

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MO – Microscópio ótico

TG – *Thermogravimetric analysis* (Análise termogravimétrica)

DTG – Derivada da análise termogravimétrica

GP – Grau de polimerização

DMEM - *Dulbecco's Eagle* Modificado

MTT - 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

SBF - *Simulated body fluid* (Fluido corporal simulado)

HEPES - 2-(hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 OBJETIVOS.....	9
2.1 OBJETIVO GERAL.....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3 Revisão bibliográfica.....	10
3.1 Biomateriais.....	10
3.2 CULTURA CELULAR 3D	11
3.2.1 Cultura celular em <i>scaffolds</i> de celulose	11
3.3 <i>Scaffolds</i>	12
3.3.1 <i>Scaffolds</i> poliméricos.....	14
3.3.2 <i>Scaffolds</i> de celulose.....	15
3.3.3 <i>Scaffolds</i> como substitutos de testes em animais	16
3. 4 Aerogel	17
3.4.1 Tipos de secagem para obtenção dos aero-, xero-, criogéis	18
3.5 Aerogel com celulose	22
3. 6 Tratamento químico de silanização por deposição a vapor.....	23
3.7 Aplicação do criogel como biomaterial.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 Materiais	26
4.2. OBTENÇÃO DA CELULOSE MICROFIBRILADA.....	26
4.3 Método de preparação do criogel	27
4.4 Caracterização do criogel	28
4.4.1 Grau de polimerização (GP)	28
4.4.2 Análise de difração de raios-x (DRX)	29
4.4.3 Porosidade e densidade.....	29
4.4.4 Área superficial – BET	30
4.4.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	31
4.4.6 Análise térmica por termogravimetria (TGA)	31
4.4.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia óptica (MO)	31
4.4.8 Absorção de fluídos	31
4.4.9 Degradação em fluido corporal simulado (SBF - <i>simulated body fluid</i>).....	32
4.4.10 Viabilidade celular.....	32
4.4.10.1 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR (NiH3T3 - fibroblastos murinos)	33
4.4.10.2 ANÁLISE DE VIABILIDADE <i>LIVE/DEAD</i> E ADESÃO CELULAR (MRC- 5 e PC-12).....	34

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
5.1 Caracterização das fibras da celulose	36
5. 1.1 Grau de polimerização (GP) da celulose	36
5. 1. 2 Difração de Raios-X (DRX) da celulose	36
5.2 Caracterização dos criogéis de celulose	38
5.2.1 Análise visual e morfologia da celulose microfibrilada	38
5.2.2 Densidade aparente e porosidade	38
5.2.3 Ensaio de área superficial (Brunauer-Emmett-Teller - BET).....	39
5.2.4 Análise morfológica	40
5. 2. 5 Termogravimetria (TGA)	42
5.2.6 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	43
5.2.7 Molhabilidade por ângulo de contato	45
5.2.8 Degradação em fluido corporal simulado (<i>SBF - simulated body fluid</i>)	47
5. 2. 9Viabilidade celular.....	49
5. 2. 9.1 Viabilidade celular com células NiH3T3	49
6. CONCLUSÃO.....	57
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	58
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

Os *scaffolds* são estruturas tridimensionais porosas que desempenham um papel essencial no suporte e crescimento de tecidos, sendo amplamente utilizados na engenharia tecidual e em estudos biomédicos. Esses materiais podem atuar tanto como equivalentes biológicos para a regeneração tecidual quanto como suportes para a proliferação celular, promovendo a reparação funcional e morfológica de áreas danificadas. A elaboração de *scaffolds* poliméricos têm sido pesquisadas pelas vantagens das suas propriedades microestruturais, como tamanho e interconectividade de poros, além da arquitetura de suas fibras, fatores fundamentais para a interação celular e para o desempenho biomédico dessas estruturas (Jafari et al., 2017).

Dentre as abordagens avançadas em cultura celular, destaca-se o uso de *scaffolds* para a criação de culturas celulares tridimensionais (3D). Essa técnica permite o crescimento e a proliferação celular em um ambiente controlado e mais semelhante ao organismo humano, o que possibilita sua aplicação em estudos de doenças, avaliação da funcionalidade de fármacos e no desenvolvimento de vacinas, por exemplo. O intuito da cultura celular 3D é a substituição dos testes em animais, os quais além de não reproduzirem corretamente o organismo humano, também possuem altos custos para implementação e envolvem preocupações éticas (Akbari et al., 2019; Koo; Huch, 2016).

Os *scaffolds* para cultura celular são biomateriais projetados para assumir uma forma que conduz, a partir de interações com sistemas vivos, a aplicação em qualquer procedimento seja este terapêutico ou de diagnóstico. É preciso que estes, sejam projetados para serem biocompatíveis, isto é, que não provoquem uma resposta imunológica do hospedeiro e/ou que sejam também capazes de se integrarem com facilidade aos tecidos envolventes. Ademais, dependendo da aplicação, é fundamental analisar a capacidade de suportar as cargas e forças mecânicas do ambiente a ser inserido, como também serem capazes de resistir à degradação e corrosão no ambiente biológico. Suas aplicações abrangem diagnósticos, cirúrgicas, terapêuticas, administração de medicamentos e dentre outros (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; WAGNER et al., 2004).

Entre os materiais estudados para aplicação em biomateriais, existem os provenientes de fontes naturais, como é o caso da celulose. A celulose é o biopolímero mais abundante que existe no planeta, é constituinte da maior parte das estruturas vegetais, e se destaca por advir de fontes renováveis. A biocompatibilidade e a biodegradabilidade atribuídas a materiais compostos por celulose são fatores determinantes para o direcionamento de suas aplicações, em

especial para a área dos biomateriais. De maneira geral, a celulose pode ser utilizada em forma de gel, em suspensão, como no caso dos hidrogéis, ou seca, obtida por diferentes métodos, a depender da aplicabilidade (Innerlohinger; Weber; Kraft, 2006).

As diferentes metodologias de secagem para a celulose influenciam nas propriedades do material e podem receber diferentes nomenclaturas, como subgrupos do aerogel. A secagem em estufa a temperatura controlada forma o chamado xerogel, que possui uma estrutura mais frágil consequente da formação dos poros do material, em que a evaporação do solvente e a redução da massa gera a ocorrência de fraturas e colapso de poros. Já o criogel, obtido por secagem em liofilizador apresenta uma melhor estabilidade dos poros quando comparada as outras metodologias de secagem. Por ser uma técnica de sublimação, torna-se menos agressiva, porém pode formar cristais que causam tensão e quebra da estrutura, dependendo das condições de temperatura e pressão que são estabelecidas. E os aerogéis em si, são formados por secagem supercrítica, e apresentam o maior número de poros e a consequente menor densidade e melhor estabilidade estrutural, devido a sua secagem precisa e controlada (García-González et al., 2012).

As propriedades físicas exclusivas do aerogel, como a baixa densidade, alta porosidade e possibilidade de controle de porosidade, tem propiciado aplicações diversas para este material, como em roupas isolantes térmicas, adsorção de impurezas e nas áreas biomédica e farmacêutica. Alguns destaques para a aplicações de criogel / aerogel em biomateriais foram apresentados pelos autores Stergar e Maver (2016), citando como destaque a funções como a administração de medicamentos, engenharia tecidual, tratamento de feridas, atuação como biossensores e diagnósticos. Adicionalmente, para aprimorar os aerogéis de acordo com a aplicação desejada, é possível atribuir funcionalizações e tratamentos químicos que permitem modificações estruturais, maior compatibilidade com um determinado meio e melhorias da estabilidade e propriedades mecânicas dos aerogéis/criogéis.

A deposição a vapor de silanos é um tipo de modificação química que acontece na superfície de materiais, e consiste na formação de um filme fino de sílica funcionalizada por um método controlado de condensação. Este método permite que este ao mesmo tempo altere o grau de hidrofilicidade / hidrofobicidade e promova maior estabilidade mecânica ao criogel, sem que afete a estrutura interna do material e sem que influencie na toxicidade. Pesquisas têm evidenciado o uso dessa técnica para aplicação em microdispositivos médicos e outros biomateriais (Wang; Ferrari, 1998).

Algumas pesquisas já apontaram para a aplicação de aerogéis/criogéis em crescimento de diferentes tipos de células (Sabri et al., 2011, 2012). No entanto, não há indícios de estudos

com criogéis que combinem o uso de diferentes silanos com a celulose para aplicações de crescimento e proliferação celular. Assim, o estudo almeja-confeccionar um criogel de celulose microfibrilada silanizado por deposição a vapor com organosilanos para ser aplicado em *scaffolds* de crescimento celular e proliferação celular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver *scaffolds* à base de criogéis de celulose microfibrilada silanizado por deposição a vapor para aplicação em cultura celular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a utilização de celulose microfibrilada, de origem vegetal e produzida por desfibrilação mecânica em um moinho de rebolos na produção de *scaffolds*;
- Analisar a influência do teor de 2% de celulose microfibrilada e o processo de secagem por liofilização na produção de *scaffolds* de celulose;
- Avaliar a influência do uso de 4 diferentes organosilanos no tratamento químico de *scaffolds* e sua aplicação por deposição a vapor;
- Realizar ensaios químicos e morfológicos que constatem a citotoxicidade, migração e proliferação celular no aerogel que permitam a sua posterior aplicação no cultivo celular.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOMATERIAIS

Os denominados biomateriais podem ser definidos como dispositivos de origem natural ou artificial, os quais entram em contato com sistemas biológicos, que compreendem desde moléculas individuais até órgãos e tecidos com o intuito de ser aplicado para substituir, aumentar ou tratar. Assim, um biomaterial é projetado para assumir uma forma que direciona, a partir de interações com sistemas vivos, o destino de qualquer procedimento seja este terapêutico ou diagnóstico. Suas aplicações visam diagnósticos, cirúrgicas, terapêuticas, administração de medicamentos e dentre outros. Podem ser constituídos de composição polimérica, cerâmica, metálica e de ligas metálicas, compósitos de matriz e fase dispersa que unam diferentes propriedades, ou ainda por materiais híbridos combinando polímeros, metais e cerâmicos (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

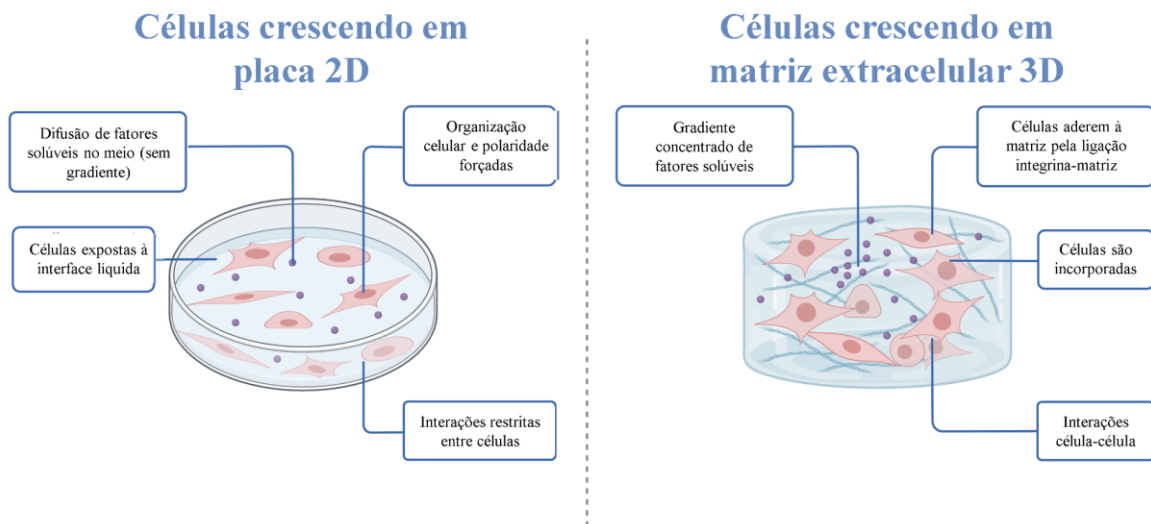
Biomateriais são divididos em 4 grupos principais conforme as reações biológicas que podem provocar no organismo: biotoleráveis, bioinertes, bioabsorvíveis e bioativos. Os biotoleráveis, atuam a partir da liberação de íons, materiais corrosivos ou químicos no corpo que formam uma película protetora, que indica a tolerabilidade do corpo com o material (quanto mais espessa, menos biotolerável). Os bioinertes são materiais inertes e estáveis dentro do corpo, possuem alta resistência à corrosão, a película é formada, entretanto é quase inexistente. Os bioabsorvíveis liberam de forma gradual e controlada, íons benéficos para a regeneração da estrutura celular, em que no final do processo, o material será totalmente absorvido pelo corpo. Por fim, os bioativos são aqueles que interagem com os tecidos naturais, e possuem propriedades osteointegração, formando ligações de natureza química com o tecido ósseo (ZHANG; WILLIAMS, 2019).

A definição do biomaterial adequado está vinculada com a sua aplicação específica e os requisitos de desempenho e propriedades que se almejam. As propriedades físicas e químicas dos materiais influenciam na sua interação com o ambiente biológico a ser inserido. Para isso, é necessário que estes, sejam projetados para serem biocompatíveis, ou seja, que não provoquem uma resposta imunológica do hospedeiro e que sejam capazes de se integrarem com sucesso aos tecidos circundantes. Além disso, é necessário observar a capacidade de suportar as cargas e forças mecânicas do ambiente desejado, assim como serem capazes de resistir à degradação e corrosão no ambiente biológico (WAGNER *et al.*, 2004).

3.2 CULTURA CELULAR 3D

A cultura de células é uma técnica fundamental para a área biológica e médica atualmente, essa técnica é empregada para cultivar e manter as células vivas fora do organismo, em um ambiente controlado. Estudos da biologia celular em cultura celular permite o melhor entendimento de doenças e tratamento de doenças, funcionalidade de medicamentos, desenvolvimento de vacinas e ainda terapia celular. Para isso, é necessário um modelo *in vitro* ideal, que imite a estrutura, a fisiologia e a patologia do órgão *in vivo* (Freshney, 2016). Cultura celular em três dimensões é uma técnica avançada que permite com que as células se proliferam formando tecidos em um ambiente similar ao organismo vivo. Essa é uma alternativa que tem ganhado destaque na substituição dos testes em animais, os quais não conseguem reproduzir com precisão o metabolismo humano, além dos altos custos e as preocupações éticas envolvidas (Akbari *et al.*, 2019). Quando comparada a cultura celular 2D, alguns fatores se destacam para os modelos tridimensionais, como a formação de gradiente no meio de cultivo. Além disso ocorre a aderência e a interação das células pela ligação das integrinas (proteínas de adesão) com a matriz (Hussey; Dziki; Badylak, 2018). A Figura 1 apresenta uma comparação da representação das diferenças da cultura celular entre placa 2D e matriz extracelular 3D.

Figura 1 - Comparação entre cultura celular 2D vs 3D



Fonte: Adaptado de Hussey, Dziki e Badylak (2018)

3.2.1 Cultura celular em *scaffolds* de celulose

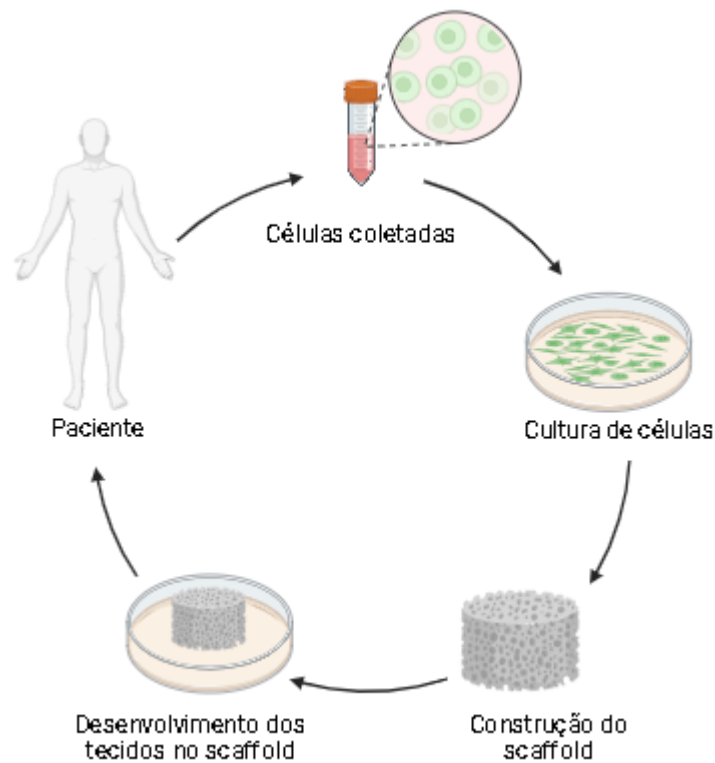
O comportamento das fibras de celulose quando secas, em especial sua microestrutura porosa e a rede interconectada de fibras e microfibras são os fatores principais para a aplicação

dos aerogéis de celulose. A presença dos grupos -OH nas fibras da celulose promove a adesão e a proliferação de células. É relatado também, a ausência de toxicidade para a membrana e na atividade mitocondrial celular e na proliferação do DNA (Mirtaghavi; Luo; Muthuraj, 2020). O tamanho do poro é uma variável importante para a cultura de células. No caso da cultura de células de fibroblastos, por exemplo, o poro assume um tamanho de 20 a 120 μm de diâmetro (PAN; JIANG; CHEN, 2006). Enquanto que, para o reparo e a regeneração do tecido ósseo, foi relatado uma faixa de 200 a 400 μm , e para o crescimento de células musculares lisas, 50 a 200 μm foi reportado como um intervalo adequado (Yang *et al.*, 2021). Dessa maneira, as espumas e os aerogéis obtidos por liofilização apresentaram os resultados mais positivos para essa aplicação, pois estão dentro dessa faixa micro de tamanho de poro.

3.3 SCAFFOLDS

A engenharia tecidual surge como uma alternativa para a implementação de substitutos de tecidos que se assemelham e conseqüentemente adaptam-se ao organismo. Solução que se dá a partir do desenvolvimento de suportes como os *scaffolds*, os quais quando associados a pele contendo a matriz extracelular cultivada irá regenerar o tecido lesado ou ainda poderá produzir um novo tecido cutâneo (DE SÁ, 2015). A Figura 2 ilustra o esquema de engenharia tecidual com o uso de *scaffolds* como suporte das células.

Figura 2 - Esquema do procedimento da engenharia tecidual com *scaffold*



Fonte: Da autora (2023)

A engenharia tecidual é uma área multidisciplinar que contempla forças químicas, biológicas e físicas que estão presentes no desenvolvimento de tecidos, nas lesões e na cura de feridas. Os quatro componentes principais utilizados pela engenharia tecidual são as células vivas, um suporte, a matriz extracelular (responsável por fornecer os fatores de crescimento) e a depender da aplicação de biorreatores, para situações de produção *ex vivo*. Os produtos dessa área podem ser utilizados em duas principais situações, sendo a primeira relacionada à construção de tecido bioartificial *in vitro* a partir de células de um doador com o intuito de substituir os tecidos ou órgãos danificados. A outra opção de aplicação é em situações de modificação *in vivo* no crescimento e função de células para regeneração *in situ* (Verma; Singh, 2014).

Em uma divisão prevista por Lanza et al. (2007), as etapas da engenharia de tecido compreendem inicialmente a realização da seleção e o processamento de um suporte conforme a célula escolhida para o trabalho. Sequencialmente, a população celular deve ser inoculada e posicionada no suporte, o qual será responsável pela fase primária de crescimento do tecido. Em seguida, este tecido deverá estar em contato com a matriz extracelular nas condições ambientais ideais para a maturação do sistema fisiológico, o qual pode ser adicionado a um

biorreator em caso de tecido *in vitro*. Por fim, após a realização de todas as etapas descritas, poderá ser efetuado o re-implante cirúrgico *in vivo*, mantendo em observação a integração do material com o meio.

3.3.1 *Scaffolds* poliméricos

Scaffolds são definidas como estruturas tridimensionais porosas, que permitem o crescimento e suporte de um tecido, atuando como uma matriz extracelular, a qual irá interagir e formar novos tecidos. A composição deve ser adequada considerando características químicas e estruturais que esse material necessita para que atue no organismo inserido, evitando possíveis rejeições e toxicidades. Os *scaffolds* poliméricos têm sido pesquisados pelas vantagens das suas propriedades, como características de microestrutura, que compreendem tamanho de poros, interconectividade e arquitetura de poros da ordem de 400 µm (variáveis de acordo com a aplicação desejada) e fibras que influenciam na interação das células com os *scaffolds* (Jafari et al., 2017).

A revisão literária apresentada por Jafari *et al* (2017), elaborou um compilado citando pesquisas com implementação de polímeros em *scaffolds* para engenharia de tecidos. Os autores dividem em duas categorias principais, as constituídas por polímeros naturais e as sintéticas, em que foram avaliadas a influência das características químicas e estruturais do *scaffold* sobre os comportamentos celulares de adesão, proliferação, migração e distinção. Os *scaffolds* possuem diversos tipos de matrizes, com destaque para os porosos, os de microesferas, hidrogéis, e os fibrosos. Em que os porosos são usados para promover crescimento ósseo, tecidos e vascularização. Os *scaffolds* de microesferas são aplicados em encapsulação de fármacos, enquanto os hidrogéis conduzem e propiciam crescimento de tecidos e cicatrização. Por fim, os *scaffolds* fibrosos, são utilizados como suportes para engenharia de tecidos e como veículo de libertação controlada de fármacos (Dhandayuthapani *et al.*, 2011).

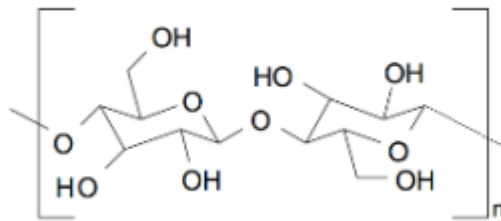
Quando se trabalha com engenharia tecidual é necessário que alguns fatores determinantes sejam avaliados, como a biocompatibilidade, e biodegradabilidade, propriedades mecânicas e químicas do material a ser implementado. Cada célula do corpo humano necessita de ambientes específicos para se proliferar, sendo assim, o *scaffold* a ser desenvolvido deve ter suas medidas, porosidade e constituição de acordo com a célula que lhe será destinado. Em suma, o *scaffold* ideal precisa apresentar em suas características: extensa rede de interconexão entre poros, para que a célula consiga migrar, se reproduzir e agregar dentro do material; possuir canais para fornecimento de oxigênio e nutrientes para as células profundas que se localizam

dentro dos *scaffolds*; sua composição química precisa permitir que os produtos de superfície e de degradação sejam compatíveis para que reações imunológicas e inflamatórias sejam mínimas; e estas devem possuir um comportamento mecânico adequado para sua aplicação final (Liu; Xia; Czernuszka, 2007).

3.3.2 Scaffolds de celulose

A celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n é um polissacarídeo, formado pela repetição do monômero, a β-d-glicose, representado na Figura 3. É o polímero natural mais abundante que existe, e se destaca por possuir fonte renovável e por ser facilmente modificada em uma variedade de derivados, contando com uma boa solubilidade e processabilidade. Quando de origem vegetal, pode ser obtida da madeira, algodão, algas, em frutos como o coco, e ainda gramíneas como o bambu. As fibras podem atingir escala micro e nanométrica, a depender do método para obtenção (Cheng et al., 2023).

Figura 3 - Representação do monômero da celulose



Fonte: Eichhon (2010)

A origem da celulose pode se dar tanto por celulose vegetal (CV) quanto por celulose bacteriana (CB). Quando se usa o termo nanocelulose está se referindo a materiais celulósicos com pelo menos uma dimensão da fibra em escala nanométrica. Dentro da nanocelulose existem as nanofibras (CNF), e a nanocelulose cristalina ou whiskers (CNC). As fibras de celulose de origem vegetal em si são produzidas por processos de branqueamento e polpação, e para que se atinjam escalas micro e nanométricas, é necessária uma etapa de desintegração por moinhos desfibriladores ou em processos de tratamento químico (Isogai, 2020).

A celulose possui uma grande gama de aplicações, devido às suas características como bom isolante térmico, resistência mecânica, interagindo bem com água, porém sendo insolúvel nela. As aplicações em destaque incluem embalagens alimentícias (Liu *et al.*, 2021), dispositivos biomédicos (Seddiqui; Kamal; Yousufi, 2021) e no campo petrolífero (Liu *et al.*,

2021) Embora a celulose seja biocompatível com o corpo humano, é importante destacar que ela não pode ser degradada. Isso ocorre porque os seres humanos não possuem celulase, uma enzima responsável pela degradação da celulose que é comumente produzida por fungos, bactérias e protozoários, bem como por algumas plantas e animais (Torgbo; Sukyai, 2020). Alguns estudos preveem a incorporação de enzimas de celulase à celulose para permitir a biodegradação do material (Hu; Catchmark, 2011). Isso não se tornaria necessariamente um problema no caso de matrizes extracelulares, como a cultura de células tridimensionais, que visa substituir os testes em animais.

3.3.3 *Scaffolds* como substitutos de testes em animais

Dentre as aplicações possíveis dos *scaffolds*, existe o uso como uma alternativa para substituir ensaios realizados em animais. A cultura celular 3D permite que as células se proliferem e formam tecidos, imitando a organização e a microarquitetura de órgãos. Além da proteção dos animais, outras vantagens se destacam, como a possibilidade de controlar variáveis, que em sistemas *in vivo*, estão atrelados a efeitos desconhecidos e a complexidade dos organismos vivos. Também é possível usar células humanas para a cultura celular, já que minimiza questionamentos sobre os resultados terem sido testados em modelo animal (Bédard *et al.*, 2020).

Com esse mecanismo de cultura celular 3D, se torna possível a produção de medicamentos personalizados, já que as células próprias do paciente podem ser usadas, permitindo testes de medicamentos, avaliação de diagnósticos e ainda a modelagem de doenças. Porém, por enquanto, a cultura celular ainda não pode substituir totalmente os ensaios em animais, devido a necessidade do uso de organismos completos para avaliar a estrutura de interação entre os órgãos e funções (Bédard *et al.*, 2020).

Os polímeros naturais têm mostrado resultados positivos para a formação de *scaffolds* 3D, em especial polissacarídeos como quitina, alginato e celulose. A celulose tanto advinda de origem vegetal, quanto de bactérias, possui excelente biocompatibilidade para aplicação em cultura celular 3D e dependendo da sua origem a celulose pode possuir propriedades ligeiramente diferentes quando aplicadas em *scaffolds*. Entre estas propriedades, se destacam a hidrofiliabilidade, e o comportamento de resistência mecânica. Além disso, ela permite a adesão, proliferação e ainda diferenciação osteogênica, características positivas para a reconstrução do tecido ósseo e implantes médicos (Donnalaja *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2019).

3. 4 AEROGEL

O desenvolvimento do aerogel é creditado a Samuel Kistler no ano de 1932, e o termo nomeia os géis que tem sua fase líquida substituída por gás, sem que ocorra o colapso do sistema sólido-gel. Nesse sistema o volume de poros desses materiais se destaca por estar na ordem de 90%, proporcionando ao aerogel a característica de baixa densidade, um dos pontos que mais agregam interesse ao material. É possível confeccionar três tipos diferentes de aerogéis de acordo com o método de produção, sendo estes: xerogel, aerogel e criogel (PIERRE, 2011).

As aplicações diversas dos aerogéis estão relacionadas com suas propriedades químicas e físicas diferenciadas, tais quais, atuação como isolante térmicos e acústicos, em eletrônicos (como os capacitores e baterias), hidrofobicidade, entre outras. Assim como, sua metodologia de secagem é responsável por definir quais as aplicações mais adequadas, já que cada uma das três secagens existentes provoca a formação de uma estrutura diferente, afetando sua porosidade que consequentemente atua nas propriedades mecânicas dos materiais (Pierre; Pajonk, 2002). A Figura 4 apresenta um criogel de celulose sobre duas flores, representando a baixa massa do material.

Figura 4 - Criogel de celulose sobre flores



Fonte: Da autora (2025)

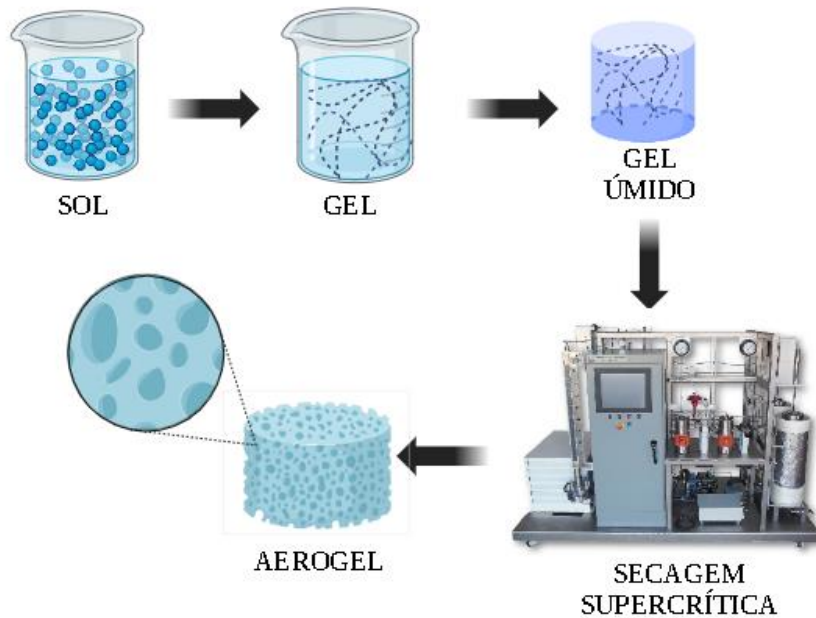
Os aerogéis são materiais com estrutura de baixa densidade e alta porosidade. Possuem propriedades de baixa transferência de calor e alta área de superfície específica. A estrutura dos aerogéis consiste em 90% de ar, e os outros 10% contendo a estrutura tridimensional de nanopartículas. E a densidade aparente de um aerogel pode atingir faixas entre 0,004-0,058 g/cm³ (García-Torres *et al.*, 2016) Estes podem ser constituídos dos mais diversos reagentes de acordo com a sua necessidade de aplicação, dentre as aplicações estão inclusas isolantes de calor e som, capacitores, pesquisas aeroespaciais, e materiais absorventes (Meti *et al.*, 2022).

Dentre os tipos de aerogéis estudados, destacam-se os constituídos de sílica, carbono e óxidos metálicos, sendo que estes podem formar compósitos e se unirem a nanofibras para formar materiais com propriedades adequadas para as mais diversas aplicações. O aerogel de carbono, é representado pelo aerografeno ou aerogel de grafeno que é considerado o material mais leve do mundo, com uma densidade de apenas 0,16 mg/cm³, em que se combina às altas propriedades mecânicas e estabilidade química do grafeno com a leveza do aerogel (Gorgolis; Galiotis, 2017).

3.4.1 Tipos de secagem para obtenção dos aero-, xero-, criogéis

A secagem supercrítica é uma técnica usada para superar alguns problemas apontados pelas outras metodologias convencionais de secagem para obtenção dos aerogéis. Seu destaque é para a preservação da alta porosidade aberta e a eliminação completa de fluidos supercríticos nos poros do gel, evitando a presença de transições intermediárias entre os estados vapor-líquido e possíveis tensões superficiais no gel, prevenindo o colapso dos poros durante a eliminação do solvente (García-González *et al.*, 2012). A Figura 5 apresenta um esquema de secagem supercrítica do aerogel.

Figura 5 - Representação da metodologia de secagem do aerogel por extração supercrítica.



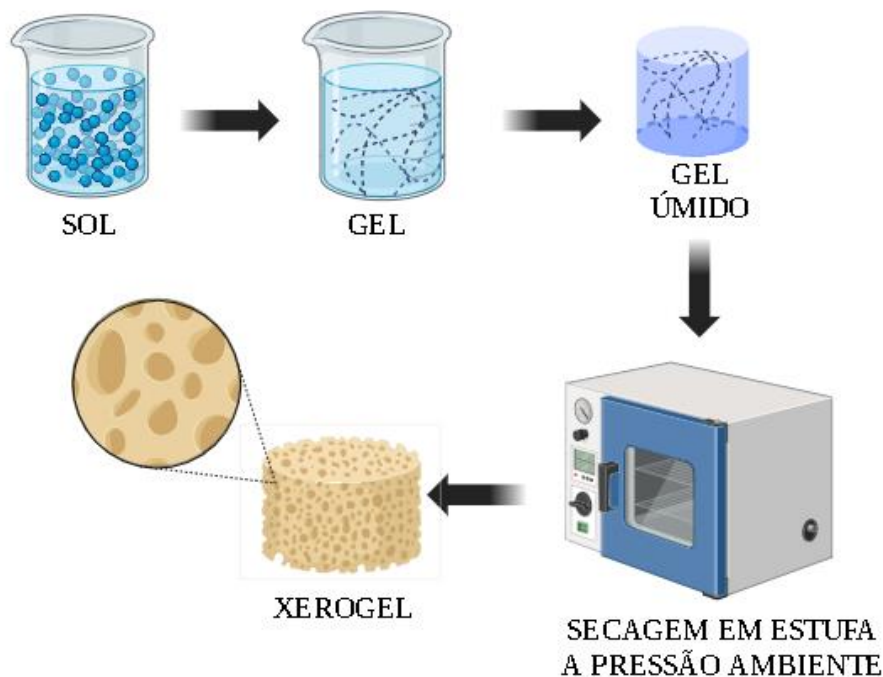
Fonte: Da autora (2023)

O aerogel de sílica foi o primeiro a ser desenvolvido e segue sendo o com maiores estudos de aplicações, podendo ser produzido a partir de diferentes organossilanos e tem sido aplicado como isolante térmico, acústico, absorvente, em sensores, e dentre outros (Soleimani Dorcheh; Abbasi, 2008). Quanto aos aerogéis de óxidos metálicos (tais como zircônio, alumínio, gálio e ferro), se destacam por apresentarem uma boa estabilidade térmica e maior resistência mecânica, porém com uma maior densidade. Assim sendo, suas aplicações destaque são voltadas a amortecedores, isoladores e materiais de apoio, atribuídos principalmente a sua resistência a compressão (Benad *et al.*, 2018). Além desses, destaca-se os aerogéis orgânicos, os quais são feitos de biopolímeros de diversas fontes renováveis como alginato, pectina, quitosana e proteínas. Por sua característica de biocompatibilidade, suas aplicações são direcionadas a funções como a administração de medicamentos, cosméticos e biocatálise (Smirnova; Gurikov, 2018).

Os xerogéis são formados por secagem lenta de evaporação de solvente sob pressão ambiente em diferentes temperaturas, e são preparados pela metodologia sol-gel. Esse procedimento consiste na hidrólise e pós-condensação de um agente em solução e na secagem a uma determinada temperatura, acima do ponto de ebulição do solvente (Akti; Balci, 2023). O

processo de secagem é o maior determinante do comportamento da estrutura, especialmente quanto ao tamanho e distribuição dos poros. Esta secagem deve ser um processo lento e de temperatura controlada, para evitar a formação de rachaduras ou fragmentação. Podem ser transparentes e translúcidos como os aerogéis dependendo principalmente da sua composição, porém com menores áreas de superfície, densidade maior e tamanho de poros menores (Gesser; Goswami, 1989). A Figura 6 representa o método de secagem por evaporação de solvente em estufa térmica e a pressão ambiente em xerogéis.

Figura 6 - Método de secagem do xerogel



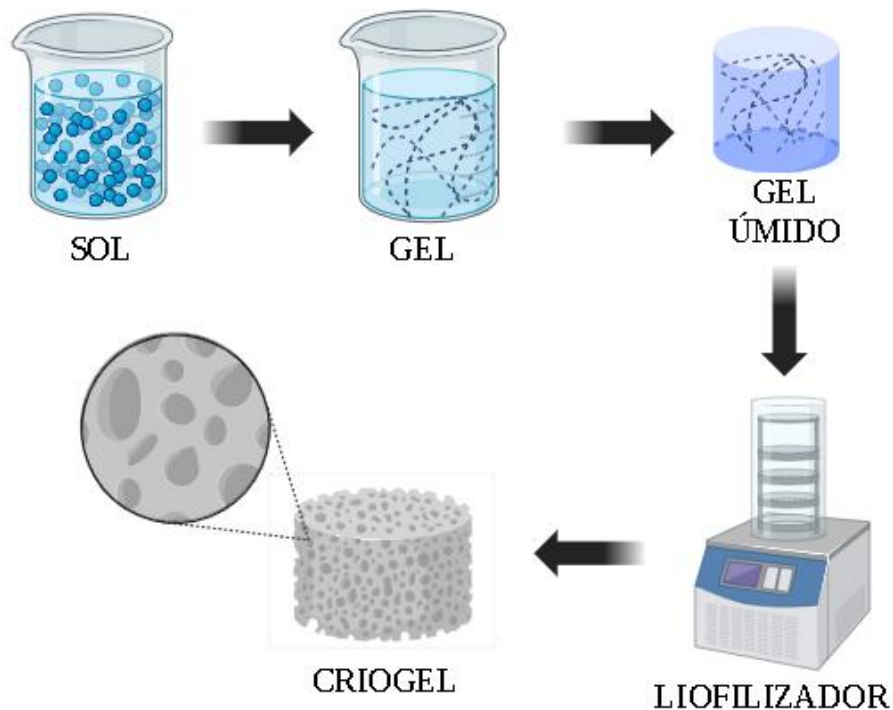
Fonte: Da autora (2023)

Esse método de secagem no ambiente não possui a capacidade de preservar a estrutura do gel. A secagem forma meniscos (tensão superficial dada pela curva na superfície de um líquido nas proximidades da borda do recipiente ou outro objeto) de vapor líquido nos poros do gel, estes recuando conforme o enxugamento dos poros ainda do gel úmido. Após a evaporação do solvente, a tensão superficial do líquido ainda contido nos nanoporos irá influenciar na pressão capilar existente nas paredes dos poros, que podem vir a colapsar. Assim, as condições de secagem do xerogel influenciam na formação dos poros estruturais do material, fazendo com que a evaporação do solvente e consequente redução da massa durante o processo, propicie a ocorrência de fraturas e colapso de poros (García-González *et al.*, 2012).

Em seus estudos, Idumah (2023) desenvolveu uma revisão sobre as atuais aplicações multifuncionais de xerogéis de acordo com a sua nanoarquitetura. Retardante de chamas, capacitores, limpeza de ar, agente coagulante, detecção e separação de gases, são algumas das principais aplicações apontadas pelo autor como estudos promissores para o uso do xerogel. A revisão de Khalil et al. (2022) retrata uma abordagem de aplicação para o xerogel que tem ganhado destaque é quanto o uso na biomedicina para a produção de materiais biopoliméricos que possam estar em contato com organismos vivos, como na administração de medicamentos, antibacteriano, cicatrizante de feridas, estruturas para engenharia tecidual e biossensores.

Os criogéis são secos por liofilização, em que são submetidos a secagem por congelamento, seguido de um tratamento térmico em atmosfera inerte. Assim como os outros tipos de aerogels, também são formados pelo método sol-gel, necessitando de um controle da área superficial, distribuição dos poros, condutividade elétrica e estabilidade termo-mecânica ao longo do seu desenvolvimento (Matović *et al.*, 2022). A Figura 7 representa as etapas para a confecção de um criogel por meio do método de secagem por liofilização.

Figura 7 - Método de secagem de criogel por liofilização



Fonte: Da autora (2023)

A técnica de secagem por liofilização, também chamada de criosecagem, acontece por meio da diminuição da temperatura do gel para outra abaixo da temperatura de cristalização do solvente empregado no procedimento necessitando que haja uma taxa de sublimação lenta para a evaporação do solvente. Além disso, exige atenção quanto ao aumento do volume do solvente causado pela cristalização, pois esta induz tensões no gel, direcionadas da borda para o centro, podendo resultar na quebra de camadas da crosta em pequenas partículas. O processo ocorre em condições de temperatura e pressão abaixo do ponto triplo, permitindo a sublimação do gelo presente na estrutura (García-González *et al.*, 2012).

A liofilização é empregada com o intuito de evitar colapsos da rede devido à pressão capilar. As amostras são congeladas em nitrogênio líquido, antes de serem posicionadas no equipamento de liofilização. O destaque para as aplicações de criogel é na área da biotecnologia, em especial na parte microbiológica, para imobilização, cultivo e isolamento de células, e ainda a captura de materiais solúveis em líquidos celulares. Essas aplicações são associadas ao controle de macroporos dos criogéis, possibilitando a criação de um ambiente inóculo para o desenvolvimento de células e a exploração de biocompatibilidade e resistência química e mecânica do material (Plieva *et al.*, 2008).

3.5 AEROGEL COM CELULOSE

A celulose é um dos principais constituintes das estruturas vegetais sendo de fonte renovável, e o biopolímero mais abundante da natureza, é uma fibra branca com uma densidade aproximada de 1,5 g/cm³. Os aerogéis reforçados com celulose e secos pelo processo de secagem supercrítica, são denominados aerocelulose. O acréscimo da celulose em aerogéis costuma estar associado a uma matriz contendo sílica em sua constituição, com o intuito de diminuir a fragilidade do material, a partir da criação de uma rede de fibras na estrutura das partículas de sílica (Innerlohinger; Weber; Kraft, 2006). Além da secagem supercrítica, os aerocelulose também podem ser elaborados com secagem por pressão ambiente (xerogel) e secagem por liofilizador (criogel).

Os estudos de Zimmermann e Zattera (2021) analisaram o potencial de reforço com celulose microfibrilada na estrutura dos aerogéis de sílica, quanto a suas propriedades mecânicas, diminuindo a fragilidade do aerogel, sem comprometer sua característica de atuação como isolante térmico. As propriedades de densidade, porosidade e estrutura de superfície determinam as condições de condutividade térmica desse material, as quais possibilitam seu emprego como isolante térmico. Outras aplicações atribuídas a esse material são para adsorção,

biomedicina, transporte de nanopartículas de metais e óxidos metálicos, entre outros (Long; Weng; Wang, 2018).

A viabilidade da celulose em aerogéis se dá por ela ser classificada como um homopolissacarídeo e conter unidades de β -1, 4-D-glucopiranosose em sua composição. Assim fazendo com que exista a tendência de criar uma conexão intramolecular de redes de hidrogênio que formam cadeias e conseqüentemente regiões cristalinas. A celulose pode ser aplicada em três formas: como nanofibras flexíveis curtas ou longas, nanocristais rígidos, e ainda como celulose bacteriana. A celulose em qualquer uma de suas formas apresentadas, possui biocompatibilidade e biodegradabilidade importantes para aplicações como biomateriais. Estas propriedades estão vinculadas a algumas funções presentes na sua estrutura como a solubilidade em água, hidrofília e não toxicidade, que associadas a estrutura da fibra que permite a produção de camadas com diferentes porosidades, essenciais para o crescimento celular e outras aplicações biomédicas (Mirtaghavi; Luo; Muthuraj, 2020).

3. 6 TRATAMENTO QUÍMICO DE SILANIZAÇÃO POR DEPOSIÇÃO A VAPOR

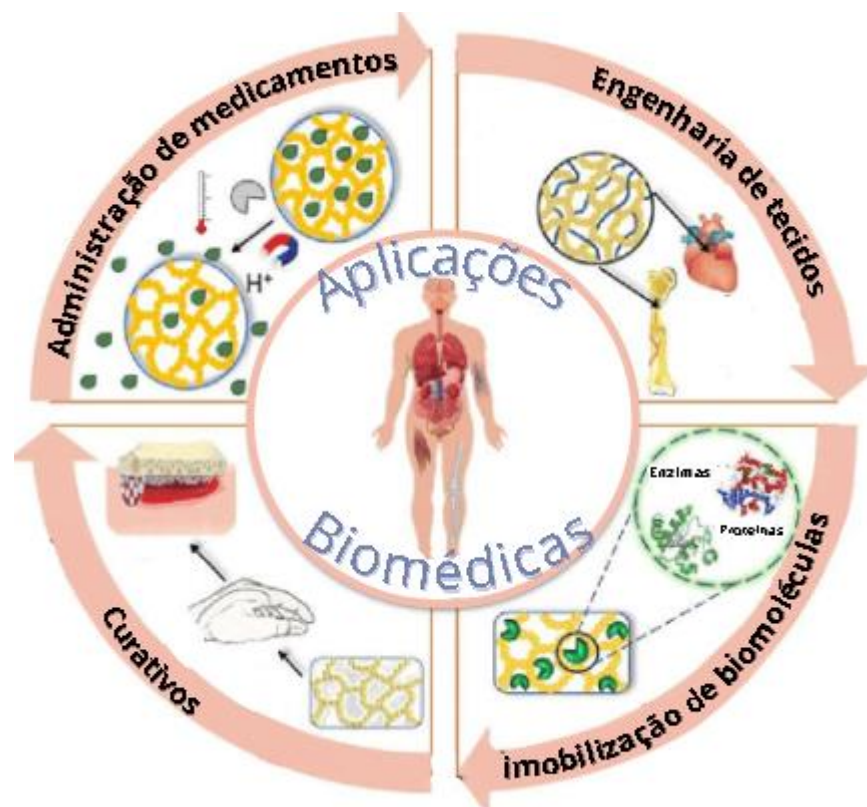
As modificações químicas de materiais, como os aerogéis, permite a funcionalização e alterações que se adaptem para a aplicação desejada. A técnica de deposição a vapor consiste em um processo controlado de condensação de um material para o depósito ou revestimento de uma superfície. Para que a deposição dessa camada de filme ocorra é necessário que tenha uma fonte de aquecimento na superfície do substrato ou em suas proximidades. O material resultante adquire a forma de um filme fino, pó ou cristal único e é empregado como um revestido com o intuito de aprimoramento de propriedades, como as mecânicas, tribológicas e químicas (PARK; Sudarshan, 2001).

A deposição a vapor com sílica como precursor, é uma das mais comuns, e pode ser efetuada com os diferentes tipos de silanos, permitindo a formação de uma camada fina de silano envolvendo o material. Na área biomédica, a aplicação desses filmes de sílica tem sido estudada para revestir microdispositivos médicos, especialmente de silicones, com o intuito de controlar a hidrofílicidade e reduzir a adsorção de proteínas indesejadas (Wang; Ferrari, 1998). As metodologias que compreendem o processo de silanização em aerogéis, possuem algumas variações quanto ao tempo necessário para silanizar e o agente utilizado, mas todas elas consistem em inserir o material que se deseja ser envolto em uma fonte de aquecimento selada juntamente com algum silano por um período de tempo que varia de 30 min a 48 horas. (Jin *et al.*, 2015; Lazzari *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2014).

3.7 APLICAÇÃO DO CRIOGEL COMO BIOMATERIAL

O potencial para aplicações farmacêuticas e biomédicas do aerogel, têm sido exploradas ao longo dos últimos anos. Stergar e Maver (2016), trouxeram em sua revisão literária algumas das principais aplicações estudadas e desenvolvidas para o aerogel na área biomédica, com destaque para a atuação como biosensores e diagnósticos de doenças, engenharia tecidual, tratamento de feridas, dispositivos implantáveis, materiais antibacterianos e ainda para administração de medicamentos. A biocompatibilidade do aerogel é comum a algumas composições devido a sua estabilidade, fazendo com que estes não sejam nocivos ou tóxicos e nem provoquem a rejeição imunológica em organismos vivos. A comprovação da biocompatibilidade dos materiais se dá por determinação da composição química e por ensaios que analisem a degradação física e mecânica. A Figura 8 ilustra as principais aplicações atuais de aerogéis no campo dos biomateriais.

Figura 8 - Aplicações de aerogéis no campo biomédico.



Fonte: Adaptado de NITA et al.(2020)

A versatilidade do aerogel e suas propriedades químicas e mecânicas ajustáveis e a extensa rede porosa que compreende a sua estrutura, é citado entre os fatores determinantes para a aplicação biomédica. A medicina regenerativa do aerogel tem sido investigada para o crescimento de diferentes células para organismos vivos, como em células renais (Sabri *et al.*,

2011) e neurais (Lynch; Skalli; Sabri, 2018). Os estudos de Sabri *et al* (2011), avaliaram a interação e crescimento de células renais e gânglios da raiz dorsal de um gambá para observar o comportamento em um aerogel de sílica reticulado por *crosslinking*, com o objetivo de futuramente aplicar em implantes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

TEOS (Tetraetoxisilano) com grau de pureza de 98 %, TEVS (Trietoxivinilsilano) com grau de pureza de 97 %, APTES ((3-Aminopropil)trietoxisilano), com grau de pureza de 99 %, e GPTMS ((3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano) com grau de pureza de 98 %, em que todos os silanos foram adquiridos pela Sigma-Aldrich® (Merk). As fibras de celulose branqueadas da espécie *Eucalyptus grandis*, foram fornecidas pela Celulose Riograndense SA (Brasil, RS) na forma de placas.

4.2. OBTENÇÃO DA CELULOSE MICROFIBRILADA

A celulose microfibrilada foi obtida por desfibrilamento mecânico. A moagem para desfibrilação da celulose foi realizada utilizando um moinho de rebolos, da marca Masscolloider Masuko Sangyo, modelo MKCA6 – 2J. A moagem foi realizada em uma suspensão com água e 3% de celulose. Neste processo, o equipamento é acoplado a uma bomba de recirculação e o tempo de moagem previsto é de 4 horas, com velocidade de 2000 rpm. O produto obtido desta operação foi uma suspensão de celulose em gel, com teor aproximado de 2,5 % de nanofibras. Após as suspensões de celulose foram centrifugadas utilizando uma centrífuga Novatecnica, modelo NT820, com velocidade de 5000 rpm por 30 minutos para estabilização da fração mássica na suspensão. O sobrenadante foi retirado do sistema e a relação sólido/água foi mensurada e estabilizada com diferentes teores de sólidos, no caso do estudo, a 2 % para a composição do criogel. Foram feitas trocas para esterilização do material com álcool 70 e a suspensão foi finalizada com uma troca do meio por água ultrapura do tipo 1. A Figura 9, ilustra as etapas para obtenção da celulose.

Figura 9 - Etapas para obtenção da celulose microfibrilada.

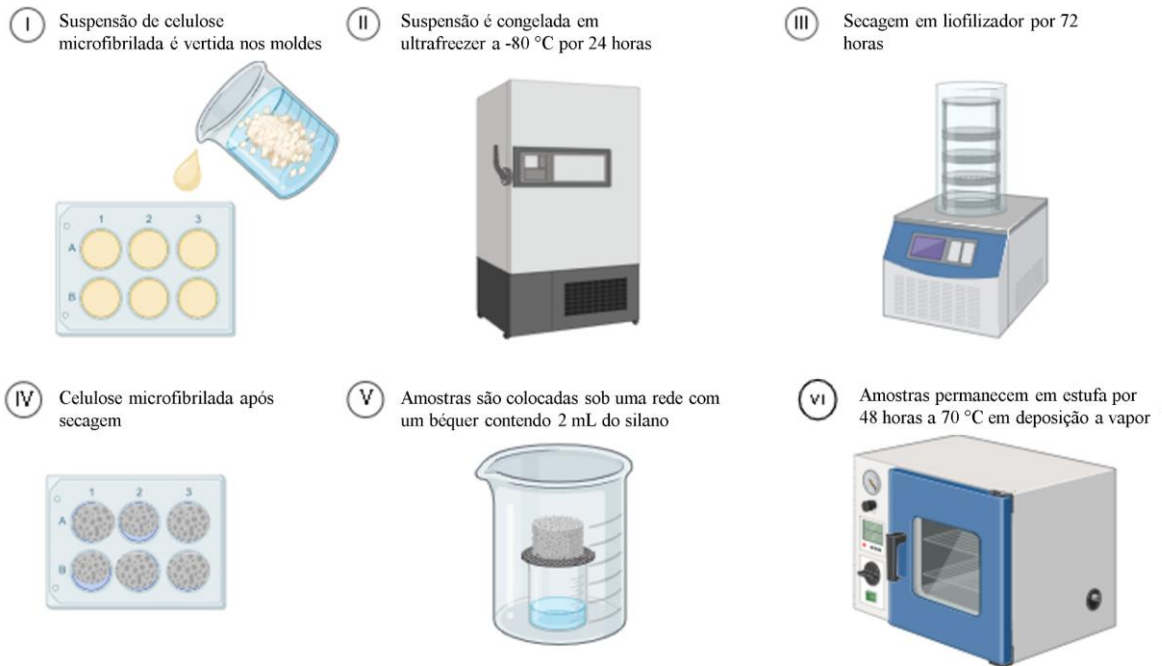


Fonte: Da autora (2024)

4.3 MÉTODO DE PREPARAÇÃO DO CRIOGEL

A metodologia empregada para obtenção dos criogéis, seguido da silanização destes por deposição a vapor, teve como base os estudos de Zanini (2016). A elaboração completa das amostras tem duração de uma semana, tendo início com o uso da suspensão de celulose a 2 %, após a etapa de sonificação. Essa suspensão é vertida em moldes, em que se utiliza placas de cultivo de 6 poços, sendo adicionados 3 mL para cada poço, nas quais o material é congelado em ultra-freezer Liotop, modelo UFR30 por 24 horas a uma temperatura de -80 °C. Com as amostras congeladas, os moldes contendo a celulose passam pela etapa de secagem em um liofilizador modelo Liotop K105®, por um período de 72 horas, para que toda a água presente na amostra seja sublimada. O resultado são amostras de celulose seca e porosa, as quais foram posicionadas em um sistema para realização da modificação química com organosilanos por deposição a vapor. Contendo um béquer de 50 mL contendo 2 mL de um dos silanos (podendo ser de TEOS, TEVS, APTES, ou ainda GPTMS), e a amostra de celulose é suspensa sobre uma rede metálica. Esse conjunto é posicionado dentro de um béquer de 250 mL, o qual é selado com papel filme. Com o sistema montado, este é encaminhado à estufa por 48 horas e a 70 °C para que ocorra o tratamento químico do material, por meio do processo de deposição a vapor. As amostras obtidas foram identificadas de acordo com o silano utilizado, usando das nomenclaturas: Cel_{branco} para amostras contendo apenas celulose, Cel_{APTES} para amostras silanizadas com APTES, Cel_{TEVS} para amostras silanizadas com TEVS, Cel_{GPTMS} para amostras silanizadas com GPTMS, e Cel_{TEOS} para amostras silanizadas com TEOS. A Figura 10 apresenta um fluxograma ilustrativo das principais etapas compreendidas na metodologia a ser aplicada para desenvolvimento do aerogel.

Figura 10 - Principais etapas da metodologia para obtenção dos criogéis



Fonte: Da autora (2024)

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO CRIOGEL

4.4.1 Grau de polimerização (GP)

O grau de polimerização (GP) das fibras de celulose, antes e após a desintegração mecânica e secagem foi realizado pelo método da viscosidade, com o auxílio de um viscosímetro Ubbelohde. Para a realização do ensaio, 50 mg de celulose foram adicionadas a 50 mL de uma solução de etilenodiamina cúprica e água (proporção de 50:50). A mistura foi agitada vigorosamente por 30 min a $23\text{ }^{\circ}\text{C}$, em um recipiente fechado com mínimo de espaço vazio (ar) para evitar processos de oxidação. Após a celulose estar dissolvida no solvente, a análise do grau de polimerização foi mensurada pela Equação 1 (Karande et al., 2011).

$$GP = \frac{200\eta_{spec}}{c(1+0.29\eta_{spec})} \quad (1)$$

Onde:

GP é o grau de polimerização;

$$\eta_{spec} = (t/t_0)^{-1};$$

η_{spec} é a viscosidade específica;

t/t_0 é a viscosidade relativa;

c é a concentração de celulose no solvente em g/L;

t_0 é o tempo requerido para o solvente ir da marcação superior a marcação inferior no viscosímetro; t é o tempo requerido para a amostra (solução) ir da marcação superior à marcação inferior no viscosímetro.

4.4.2 Análise de difração de raios-x (DRX)

A análise foi realizada utilizando um espectrofotômetro Shimadzu, modelo XRD-600, a 40 kV e 30 mA, com radiação $\text{CuK}\alpha$, $\lambda=1,5406 \text{ \AA}$, e passo angular de $0,05^\circ / 2 \text{ s}$. As amostras foram analisadas no intervalo angular de 3° a 40° (ângulo de Bragg = 2θ). Para calcular o índice de cristalinidade (IC) foi utilizado o método proposto por Segal, com base na Equação 2, este método foi escolhido porque é comumente utilizado em estudos de celulose (Haafiz *et al.*, 2014).

$$\text{IC} = \frac{I_{(200)} - I_{(am)}}{I_{(200)}} \times 100 \quad (2)$$

Em que,

$I(200)$ é a intensidade do pico de difração no plano cristalino;

$I(am)$ é o halo amorfo quando 2θ é de aproximadamente 16° .

4.4.3 Porosidade e densidade

Os valores de densidade e porosidade foram determinados a partir da metodologia aplicada por Sehaqui *et al* (2011). Em que a densidade dos aerogéis foram estimadas a partir da divisão do seu peso pelo seu volume, conforme a medição a ser realizada por paquímetro e balança de precisão. Então, a porosidade foi calculada pela Equação 3, contendo a densidade relativa ($\rho_{aerogel}/\rho_{celulose}$).

$$\text{Porosidade (\%)} = \left(1 - \frac{\rho_{aerogel}}{\rho_{celulose}}\right) \times 100 \quad (3)$$

Em que:

$\rho_{aerogel}$ = densidade do aerogel;

$\rho_{celulose}$ = densidade da celulose.

A densidade da celulose foi medida com o auxílio de um picnômetro a gás hélio modelo AccuPyc 1340, Micromeritics, USA. Em que as medições foram feitas em triplicata, com base na massa em gramas de cada uma delas que foi inserida ao equipamento, e geraram a densidade média da celulose.

4.4.4 Área superficial – BET

O ensaio para a avaliação da área e do volume superficial específico e o consequente tamanho de poros dos aerogéis foi realizado pela metodologia de Brunauer-Emmett-Teller (SSA_{BET}). A partir da caracterização pelo sistema de adsorção física de gases, neste caso foi usado como adsorvato o gás N_2 a uma temperatura de 77 K. Anteriormente à inserção da amostra, é preciso que seja seca em estufa a vácuo em uma temperatura de 300 °C por um período de 24 horas e após mantidas em dessecador de sílica por 4 horas (Choi *et al.*, 2018). Para se obter o valor do tamanho de poros, usou-se da Equação 4, para inicialmente determinar o volume de poros dos criogéis.

$$Vp = \frac{1}{\rho_a} - \frac{1}{\rho_r} \quad (4)$$

Em que:

Vp = volume de poros

ρ_a = densidade aparente;

ρ_r = densidade real.

A partir do volume de poros, é possível determinar o tamanho de poros com base na Equação 5.

$$\Phi = \frac{4Vp}{S_{BET}} \quad (5)$$

Em que:

Φ = tamanho de poros;

Vp = volume de poros;

S_{BET} = área superficial (BET).

4.4.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise foi realizada em espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com acessório de refletância total atenuada (ATR-FTIR, Tensor II modelo, Bruker). Com o intuito de determinar os grupos funcionais presentes nas amostras de criogéis de celulose e dos criogéis de celulose silanizadas. Além disso, foram feitos FTIR de cada um dos organosilanos usados para a deposição a vapor, para efeitos de comparação com os resultados obtidos para as amostras, e permitir a identificação das bandas presentes.

4.4.6 Análise térmica por termogravimetria (TGA)

A análise de termogravimetria foi avaliada pela degradação ou perda de massa com relação a temperatura exposta. As propriedades térmicas das amostras foram obtidas por meio de um analisador de TGA (SDT-Q600, TA Instruments) com atmosfera de nitrogênio, a uma taxa de aquecimento de 10°C/min e uma faixa de temperatura de 25-1000°C.

4.4.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia óptica (MO)

A análise de caracterização morfológica dos aerogéis, se deu com o microscópio óptico (MO) modelo Axio Scope A1 da marca ZEISS. E por microscopia eletrônica de varredura (MEV) modelo EVO MA10 da marca Zeiss. As amostras foram previamente revestidas com ~1-2 nm de espessura de ouro no equipamento de modelo Q156R-ES da marca Quorum. Em que por consequência da necessidade de interação do feixe eletrônico com a amostra, foi realizada uma deposição de íons metálicos de ouro sobre estas, para torná-las condutoras, antes do início da análise. Em seguida, a partir das imagens obtidas pelo MEV, o diâmetro das fibras e o melhoramento da qualidade das imagens foram avaliados com o auxílio do *software* ImageJ.

4.4.8 Absorção de fluídos

A elaboração do fluido corporal simulado (*SBF - simulated body fluid*) foi realizada de acordo com a ISO 23317. A preparação do fluido usou dos componentes: água destilada, NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄.3H₂O, MgCl₂.6H₂O, HCl (c=1 mol/L), CaCl₂, Na₂SO₄, e TRIS. Em que a composição foi preparada em um béquer de polietileno, à temperatura de 36,5 °C ± 1,5°C,

controlando o pH da solução durante todo o processo em aproximadamente 7,4. Em seguida, o SBF foi armazenado em geladeira, para que ocorresse a sequência do ensaio.

A capacidade de absorção de fluídos por degradação e perda de massa nos aerogéis foi quantificada por imersão das amostras em um recipiente fechado à temperatura de 37°C, com 3 mL do líquido (fluido corporal simulado). Medindo-se o peso inicial e a área superficial aparente das amostras empregadas. As medições de perda de massa foram feitas nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias, com trocas de fluídos feitas com um espaçamento de 2 dias, em que o excesso de líquido na superfície foi cuidadosamente retirado com o auxílio de papel filtro antes da pesagem. Por fim, o grau de absorção de fluídos pelos aerogéis deverá ser calculado a partir das massas iniciais e finais das amostras, como apresentado na Equação 6. Esta análise foi realizada em triplicata (n=3) para o cálculo de média e desvio padrão.

$$C_{\text{absorção}} = \frac{M_s - M_0}{M_0} \quad (6)$$

Em que:

M_s = massa final da amostra (mg);

M_0 = massa inicial da amostra (mg).

4.4.9 Degradação em fluido corporal simulado (SBF - *simulated body fluid*)

No ensaio de investigação do ângulo de molhabilidade entre o líquido e a superfície dos aerogéis, é feito por meio de fotografias da superfície da amostra contendo uma gota, posicionada com o auxílio de uma pipeta. Após coletada as imagens, com o uso do software SurfTens, foi estimado o ângulo de contato entre a superfície e a gota de água. Com isso, será possível prever se os fluidos poderão molhar ou não a superfície do material, em que quando obtido um ângulo menor que 90°, se é considerado que a superfície é molhada pelo líquido (hidrofílica), enquanto que se os ângulos forem maiores que 90°, a superfície será caracterizada como hidrofóbica. Para a classificação do grau de molhabilidade entre o líquido e o aerogel, serão utilizados os valores de ângulos de contato de líquidos com superfícies sólidas.

4.4.10 Viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados por duas abordagens diferentes. Em que a citotoxicidade avaliada com as células do tipo NiH3T3 foram feitas com os criogéis desintegrados e transformados novamente em uma suspensão de 2 % em água ultrapura tipo 1.

E para as células MRC-5 e PC-12 os ensaios se deram nas próprias amostras de criogéis obtidas na forma de discos, para testar a aplicação com *scaffold* para sustentação celular.

4.4.10.1 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR (NiH3T3 - fibroblastos murinos)

Para esse ensaio foi utilizada uma linhagem celular imortalizada de fibroblastos murinos (NiH3T3). A escolha da linhagem celular NiH3T3, deve-se à sua ampla utilização como controle em estudos de citotoxicidade de diferentes compostos, garantindo a confiabilidade, reprodutibilidade e a comparabilidade dos resultados obtidos (SCUSSEL, *et al* 2022). A linhagem celular (NiH3T3) foi cultivada em garrafas de plástico de 25 cm², com meio *Dulbecco's Eagle* Modificado (DMEM), suplementadas com 10 % de Soro Fetal Bovino, Penicilina (100 unidades/mL) e Estreptomicina (100 mg/mL). Para o crescimento e adesão celular, as células foram mantidas em uma estufa umidificada, com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C. As trocas de meio foram realizadas em dias alternados, até se obter uma confluência de células viáveis (80 %), para o desenvolvimento dos experimentos *in vitro*. Ao obter a confluência necessária, as células foram tripsinizadas com 4 mL de tripsina durante 5 min, seguido da neutralização da mesma com 4 mL de DMEM (De-Pieri *et al.*, 2024).

Em seguida, foi realizada a contagem do número total de células, na câmara *Neubauer* e realizada a diluição em meio DMEM na concentração de 10⁴ células/poço e plaqueadas em uma placa de cultura de fundo plano de 96 poços. As mesmas foram incubadas por 24 horas em uma incubadora umidificada, com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C, a fim de proporcionar a aderência das células na superfície da placa. Após o período de aderência, as células foram tratadas com as amostras dos criogéis de celulose silanizados (Cel_{GPTMS}; Cel_{APTES}; Cel_{TEVS} e Cel_{TEOS}) diluídas em DMEM em diferentes concentrações (0,1; 0,5 e 1%) por 24, 48 e 72 horas.

A viabilidade celular foi avaliada por meio da redução do brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Quando reduzido, o MTT forma cristais de formazan, um sal de coloração roxa e insolúvel em água. Esta reação de redução ocorre nas mitocôndrias das células, resultando em uma correlação direta entre a produção dos cristais de formazan e a viabilidade celular (De-Pieri *et al.*, 2024; Mosmann, 1983; Scussel *et al.*, 2022). Para isso, após os períodos de incubação (24, 48 e 72 horas) das células com as amostras de criogéis o sobrenadante celular foi cuidadosamente retirado.

Em seguida, 100 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados a cada poço. A placa foi então incubada por três horas em uma estufa a 37 °C e 5% de CO₂, permitindo a formação dos cristais de formazan. Após o período de incubação, o sobrenadante celular foi removido, e os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 µL de álcool isopropílico. Por

fim, a placa foi analisada em um leitor de placas por absorvância, no comprimento de onda de 570 nm. A viabilidade celular foi apresentada em porcentagem de células viáveis é determinada por meio da comparação dos resultados das absorvâncias dos grupos testes (Cel_{GPTMS}; Cel_{APTES}; Cel_{TEVS} e Cel_{TEOS}), com as absorvâncias do grupo Controle (100 % de células vivas), o qual foi exposto apenas ao DMEM.

As análises de viabilidade celular para a célula NiH3T3 (fibroblastos murinos) foram realizadas por meio da análise de variância de *two-way* ANOVA. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão, considerando os valores de $p \leq 0,05$ como estatisticamente significativos. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes em dias alternados, utilizando diferentes passagens celulares, garantindo a reprodutibilidade dos resultados. Para a análise dos dados e a construção dos gráficos, foi utilizado o software GraphPad Prism, versão 9.1.1. Enquanto que para as células MRC-5 e PC-12, a análise dos resultados dos experimentos foram analisados utilizando o software Microsoft Office Excel e expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). Para a avaliação estatística, foi empregada Análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste pós-hoc de Tukey utilizando o programa estatístico SPSS (IBM SPSS Statistics 21; SPSS Inc, Chicago, EUA). O valor mínimo de “p” considerado como estatisticamente significante foi definido como inferior a 0,05.

4.4.10.2 ANÁLISE DE VIABILIDADE *LIVE/DEAD* E ADESÃO CELULAR (MRC-5 e PC-12)

Para esta cultura celular, foram usadas células da linhagem MRC-5, fibroblastos diplóides, e da linhagem celular PC-12, derivada de feocromocitoma. As células MRC-5 foram cultivadas meio de cultura DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma-Aldrich) de baixa glicose suplementado com 10% de soro bovino fetal (Laborclin), 2,5 g/L de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico (HEPES, Sigma-Aldrich), 3,7 g/L bicarbonato de sódio (Neon), 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (1% P/S, Sigma-Aldrich) e o pH ajustado para 7,2. As células PC-12 foram mantidas em meio de cultura DMEM de alta glicose suplementado com 10% de soro equino (Laborclin) e 5% de soro bovino fetal (Laborclin), com as mesmas quantidades de HEPES, bicarbonato de sódio, P/S e pH descritos anteriormente. As culturas permaneceram em incubadora umidificada com atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C.

Os materiais foram esterilizados em autoclave e acondicionados em placas de cultura de 48 poços (Kasvi). As culturas de células MRC-5 e PC-12 aderidas em garrafas de cultura e foram submetidas a 0,5% tripsina/0,2% EDTA (Sigma-Aldrich) em tampão fosfato salino (PBS), para descolamento do plástico. Foram adicionadas 60.000 células em 300 μ L de meio de cultura em cada *scaffold* ou nos poços de cultura, utilizados como controle. Após cerca de uma hora, cada poço foi completado com 1 mL de meio de cultura e incubado por 24 horas para realização dos testes descritos a seguir.

Para visualização da adesão das células por microscopia de fluorescência, foi removido o meio de cultura e utilizado PBS para lavagem. Para o teste com dicloridrato de 4',6-diamidina-2'-fenilindol (DAPI), as células aderidas foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 24h. Em seguida, as amostras foram novamente lavadas com PBS, e os núcleos das células aderidas foram corados com 50 μ g/mL de DAPI dissolvido em PBS, seguido por uma nova lavagem com PBS (Maurmann *et al.*, 2017). As imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência (Leica Dmi8, Leica Microsystems) com magnificação de 100x.

As células vivas foram coradas com 10 μ g/mL de diacetato de fluoresceína (FDA, Sigma-Aldrich) e as células mortas com 5 μ g/mL de iodeto de propídio (PI, Sigma-Aldrich) dissolvidos em tampão salino fosfato (PBS) por 7 min. Como controle de morte celular nesse teste, foi utilizado etanol sobre as células cultivadas na placa de cultura. A viabilidade das células foi quantificada por meio do ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) direto (n=6 em cada teste). Para os testes de MTT, foram utilizados controle de morte celular 1% de Triton X-100 em água por 10 minutos (imediatamente antes do MTT) sobre as células cultivadas diretamente nos poços da placa de cultura. Foi utilizado 1 mL por poço de 0,25 mg/mL de MTT dissolvido em tampão livre de cálcio e magnésio (CMF). Após 3 horas a 37°C, foi retirado o MTT dos poços e 0,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado para que cristais de formazan fossem dissolvidos. Foram lidos 250 μ L em espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular devices – Molecular devices®) em placa de 96 poços e o resultado calculado pela diferença de absorbâncias nos comprimentos de onda de 570 e 630 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS DA CELULOSE

5.1.1 Grau de polimerização (GP) da celulose

O grau de polimerização das fibras de celulose antes e após a moagem mecânica e respectivos processos de secagem, está apresentado na Tabela 1. O GP é definido como o número de unidades de repetição de unidades de glicose presentes na celulose. Com a moagem mecânica, as amostras de celulose são submetidas ao corte e desintegração pelas forças de atrito com eventuais cisões da cadeia do polímero, promovendo assim uma redução significativa no GP. O grau de polimerização apresentou uma redução significativa para a celulose utilizada, no qual é observado uma redução de aproximadamente 36% após a moagem mecânica.

Tabela 1 - Grau de polimerização das fibras de celulose antes e após a moagem mecânica

Amostra	Grau de polimerização
Celulose	1230
Celulose microfibrilada	787

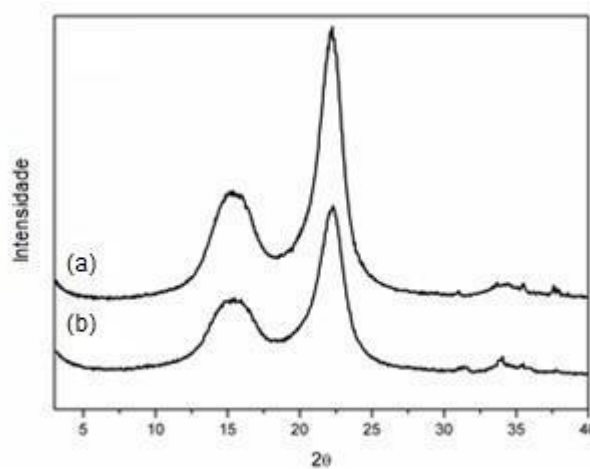
Fonte: Da autora (2025)

Segundo Karande et al. (2011), os parâmetros de produção da celulose microfibrilada têm influência significativa no grau de polimerização. Durante o processo de desfibrilação, as fibras são submetidas a forças de cisalhamento e fricção que promovem a cisão de cadeias e a formação de fibras menores (fibrilação) que causam a redução do grau de polimerização.

5.1.2 Difração de Raios-X (DRX) da celulose

A Figura 11 apresenta os difratogramas de Raio X da celulose antes e após o processo de moagem. As amostras de celulose apresentaram dois picos característicos em $2\theta \approx 15.2^\circ$, 22.9° . O pico a $2\theta \approx 15.2^\circ$ reflete as contribuições dos picos sobrepostos 1-10 e 110 ($14,8^\circ$ e $16,7^\circ$ respectivamente), e o pico a $2\theta \approx 22.9^\circ$ é decorrente do plano cristalino (200). Quanto à fração cristalina, há uma pequena redução dos valores de cristalinidade após o desfibrilamento mecânico das amostras. Em que os picos das amostras de celulose (a), foram mais intensos e mais estreitos quando comparados à amostra celulose microfibrilada (b). O índice de cristalinidade (IC), corresponde à porcentagem de celulose que está organizada em intervalos cristalinos, os valores de IC obtidos indicaram 80,2% para a celulose e 69,3% para a celulose microfibrilada.

Figura 11 - Difratomogramas obtidos por DRX da (a) celulose e da (b) celulose microfibrilada

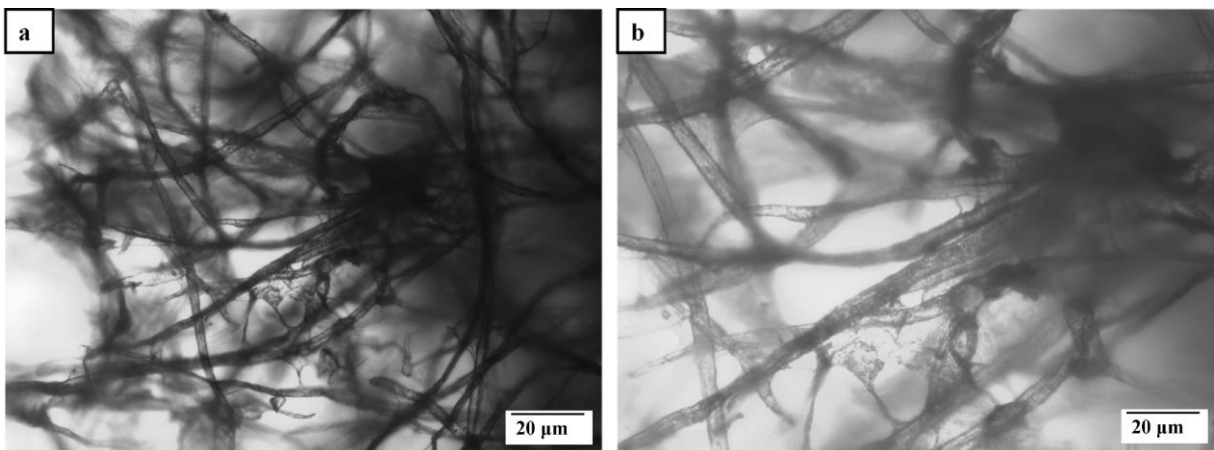


Fonte: Da autora (2024)

Após o processo de desfibrilamento no moinho, é observado uma redução do IC de aproximadamente 11% das amostras de celulose para a microfibrilada, o que sugere um aumento da fase amorfa nesta amostra. Essa redução da cristalinidade é decorrente da desfibrilação mecânica promover uma redução substancial do tamanho de partículas, destruindo os segmentos cristalinos da celulose, devido às forças de cisalhamento impostas pelo método de moagem (Karande *et al.*, 2011).

A Figura 12 apresenta a micrografia obtida por MO da suspensão de celulose (2 %). Observa-se que as fibras de celulose em escala micrométrica e algumas “teias” formadas por fibras menores (fibrilas).

Figura 12 - Suspensão de celulose observada em MO em a) e b) para dois pontos diferentes



Fonte: Da autora (2025)

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS CRIOGÉIS DE CELULOSE

5.2.1 Análise visual e morfologia da celulose microfibrilada

A Figura 13 apresenta a imagem fotográfica das amostras de criogel produzidas, com e sem modificação química por silanos. As amostras foram produzidas no formato de “discos” com um diâmetro de 3 cm e uma espessura de 0,3 cm. Não houve diferença de aspecto visual entre as amostras.

Figura 13 - Amostras de criogéis



Fonte: Da autora (2025)

5.2.2 Densidade aparente e porosidade

A Tabela 2, apresenta os valores da densidade aparente e porosidade dos criogéis de celulose. A densidade aparente dos criogéis de celulose foi obtida pela relação massa (g) e volume (cm³). A faixa de densidade aparente das amostras ficou entre 0,0156-0,0240 g/cm³. Como o teor de sólidos para todas as composições manteve-se o mesmo (2% de celulose), não foram observadas variações significativas entre as amostras produzidas. A amostra com maior densidade aparente é a Cel_{branco}. Era esperado que a adição do silano ocasionasse o aumento da densidade aparente, porém durante o processo de silanização por deposição a vapor, ocorreu uma expansão do volume dos criogéis, o que impactou na diminuição da densidade aparente dos mesmos. Dados da literatura trazem valores de densidades médias para criogéis de celulose microfibrilada similares e próximas às encontradas nas amostras desenvolvidas neste trabalho (Lazzari *et al.*, 2017; Sehaqui; Zhou; Berglund, 2011). A média de porosidade dos aerogéis ficou em 98,93%, similares aos valores reportados por outros autores com procedimentos experimentais semelhantes (Lazzari *et al.*, 2017; Mirtaghavi; Luo; Muthuraj, 2020). A faixa de porosidade obtida para aerogéis de celulose na literatura indicam variações entre 98-99 %

Tabela 2 - Densidade aparente e porosidade das amostras

Amostra	Densidade criogel (g/cm ³)	Porosidade (%)
Cel _{branco}	0,0240 ± 0,0006	98,67610
Cel _{APTES}	0,0225 ± 0,0008	98,75816
Cel _{TEOS}	0,0164 ± 0,0003	99,09132
Cel _{GPTMS}	0,0178 ± 0,0004	99,01922
Cel _{TEVS}	0,0156 ± 0,0002	99,13818

Fonte: Da autora (2024)

A densidade real da celulose microfibrilada foi obtida por meio do uso do picnômetro de densidade dos sólidos a gás. As medições foram feitas em triplicata pelo equipamento, obtendo-se uma densidade real média da fração de sólidos de $1,81 \pm 0,028$ g/cm³. A densidade real prevista na literatura para a celulose é de 1,5 g/cm³ (Wu *et al.*, 2020). Com esse valor foi possível descobrir a porcentagem de porosidade do material. Os valores obtidos de densidade real e densidade aparente do aerogel de celulose, permitiu estimar a porosidade deste material.

5.2.3 Ensaio de área superficial (Brunauer-Emmett-Teller - BET)

No ensaio de área superficial feito por Brunauer-Emmett-Teller, o valor médio obtido foi de $25,115 \pm 0,022$ m²/g. Entre as amostras de criogéis não foram observadas variações significativas na análise de porosidade por BET. A área superficial por BET de aerogéis de celulose variam de acordo com o método de secagem adotado, com o tipo de celulose usado (fibras ou cristais), com a largura das fibrilas de celulose usadas e ainda com a concentração de celulose usada (Mahfoudhi; Boufi, 2017). Ciftci *et al.*, (2017), produziu aerogéis com 2 % de celulose microfibrilada por dois métodos, por secagem supercrítica com CO₂, obtendo uma área superficial específica de 115 m²/g e por secagem em liofilizador obtendo 20 m²/g de área superficial, sugerindo que esse valor é maior para secagem supercrítica. O tamanho de poros foi determinado pelas equações de volume e tamanho de poros, em que este foi de 8,18 µm.

A Figura 14 apresenta o esquema de classificação do tamanho dos poros desenvolvido em comparação com o esquema usado pela IUPAC (Everett, 1972). A classificação dos poros de acordo com a IUPAC em materiais porosos, como os criogés, é feita da seguinte forma - microporoso: poros de até 2 nanômetros (nm) de largura; - mesoporoso: poros entre 2 e 50 nm de largura; e macroporo: poros maiores que 50 nm. Os estudos de Mays, (2007) trouxeram uma

nova escala, em que foi aplicada uma classificação de poros que considera nanoporos, microporos e miliporos. E cada um deles apresenta uma categoria ainda menor de classificação sub, inter e super.

O método de secagem por liofilização é o principal responsável pela formação da estrutura hierárquica de poros distribuídos, devido à sublimação dos cristais de gelo presentes na amostra durante o processo de secagem, contendo poros que podem ser classificados tanto como microporos, quanto algumas formações de meso e macroporos (Jiang *et al.*, 2020). Com base nas micrografias da Figura 16, e na classificação prevista por Mays, (2007) e IUPAC (Everett, 1972), os criogéis produzidos podem ser classificados como microporosos. Com subclassificação super-, para um tamanho de poros que está na faixa entre 10-100 μm .

Figura 144 - Esquema de classificação de tamanho de poros de Mays, (2007) e o esquema usado pela IUPAC (1972)

CLASSIFICAÇÃO DO TAMANHO DE POROS									
Microporo			Mesoporo			Macroporo			Esquema IUPAC
2 nm			50 nm						
						Esquema de Mays			
Nanoporo			Microporo			Miliporo			
sub-	inter-	super-	sub-	inter-	super-	sub-	inter-	super-	
0,1 nm	1 nm	10 nm	100 nm	1 μm	10 μm	100 μm	1 mm	10 mm	100 mm

Fonte: Adaptado de Everett, (1972) e Mays, (2007)

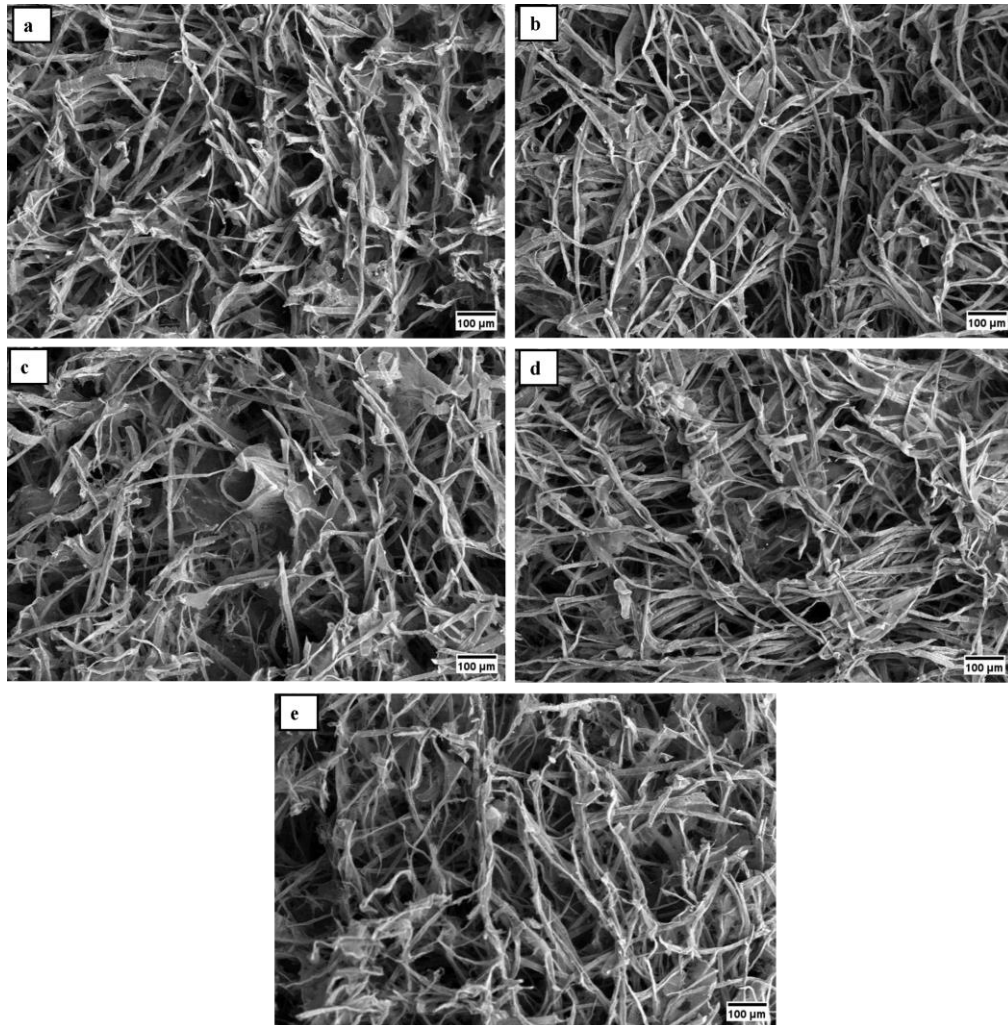
O tamanho de poros necessário para o crescimento celular pode variar com o tipo de célula que se deseja cultivar. Como por exemplo, as células de fibroblastos, que apresentam uma boa proliferação em uma faixa de 100-250 μm (Choi *et al.*, 2018). Já no caso das células neurais como a PC-12, o tamanho de poros ideal na faixa de 100 μm (Bružauskaitė *et al.*, 2016). Sendo assim, a estimativa de faixa de poros para os *scaffolds*, se mantém na classificação de materiais microporosos, tornando o criogel de celulose adequado para esta aplicação.

5.2.4 Análise morfológica

A Figura 15 apresenta as micrografias obtidas por MEV dos criogéis de celulose com e sem o tratamento químico de silanização. O ensaio de MEV foi realizado com o intuito de

visualizar os criogéis e as fibras de celulose com detalhes. Comparativamente, não foram registradas diferenças perceptíveis e significativas entre as amostras analisadas. O diâmetro da fibra foi medido em triplicata com o auxílio do software ImageJ, atingindo uma faixa que varia de 8-9 μm e a sua estrutura tridimensional é composta por poros abertos e interconectados.

Figura 15 - Micrografias obtidas por MEV das amostras a) Cel_{branco}; b) Cel_{APTES}; c) Cel_{TEOS}; d) Cel_{TEVS} e) Cel_{GPTMS}, com magnificação de 100 \times .

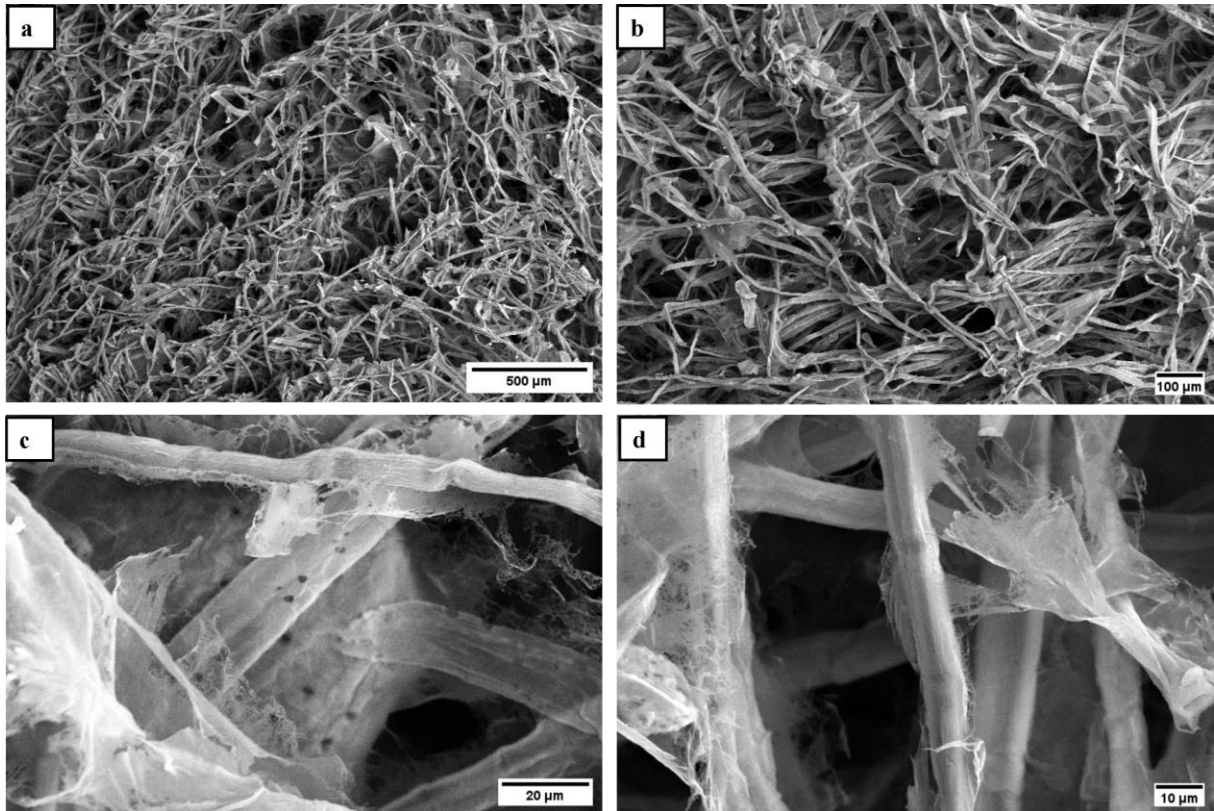


Fonte: Da autora (2024)

A Figura 16 apresenta as micrografias obtidas por MEV em diferentes magnificações de 50, 100, 1000 e 2500 \times da amostra Cel_{branco}. Observa-se a presença de não apenas das microfibras de celulose, como também de alguns pontos que se aproximam de uma nanoestrutura da fibra. Entretanto, por conta da quantidade de microfibras se sobressair a quantidade de nanofibras visíveis, a celulose se encaixa na classificação de celulose microfibrilada. Segundo os estudos de Singh; Pahal; Ahuja, (2020), essa formação de rede

emaranhada contendo tanto celulose micro- quanto nanofibriladas, torna o ambiente desejável na promoção do crescimento e proliferação celular, por conta da formação de poros que mimetizam o ambiente de formação de tecidos.

Figura 156 - Micrografias dos criogéis de celulose com resolução de a) 500 μm ; b) 100 μm ; c) 20 μm e d) 10 μm



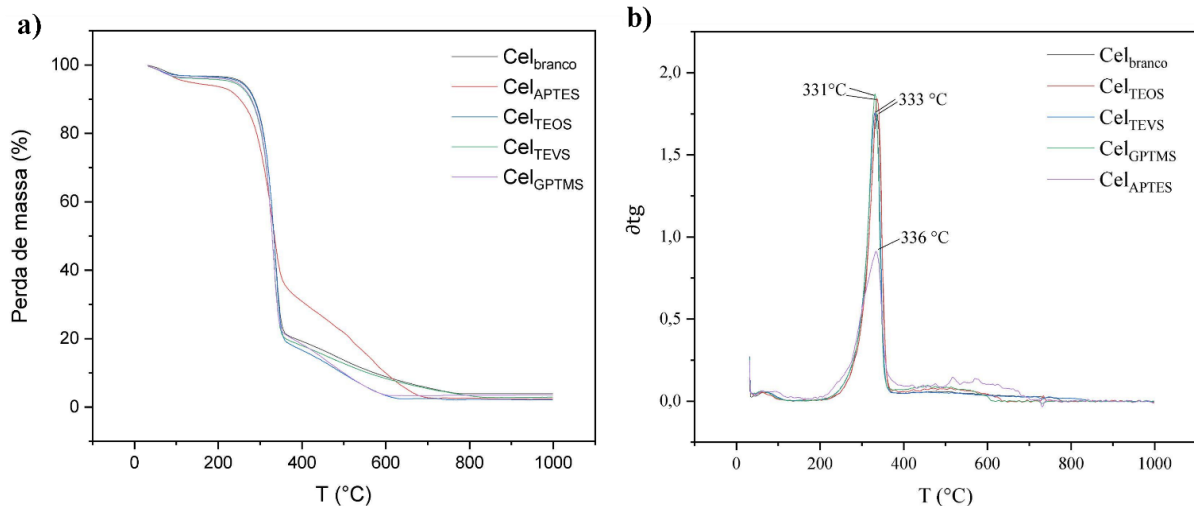
Fonte: Da autora (2024)

5. 2. 5 Termogravimetria (TGA)

A Figura 17(a) apresenta o termograma obtido por TGA e a Figura 17(b) a derivada da termogravimetria (DTG) das amostras de celulose secas e silanizadas por deposição a vapor. É possível observar os três principais eventos da perda de massa da celulose. Na faixa de 25-100°C, ocorre a perda da umidade, com a evaporação da água presente na composição do criogel / celulose. No segundo evento tem a ocorrência do maior percentual de perda de massa para uma faixa de temperatura entre 230-390°C, evento que está associado à reação de despolimerização da celulose. E por fim, o terceiro evento presente no termograma para temperaturas acima de 390°C, compreende a decomposição térmica da fração residual da

celulose (De Rosa *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2013; Zanini, 2016). Quanto à DTG, observa-se que os eventos de maior intensidade de reação ocorrem nas temperaturas de 331 a 336 °C.

Figura 16 - Gráfico de termogravimetria com as curvas a) TG e b) DTG dos criogéis



Fonte: Da autora (2025)

Para as amostras silanizadas com APTES, a perda de massa foi menor quando se comparada às outras amostras em uma mesma faixa de temperatura. A funcionalização com esse silano levou a um leve aumento na estabilidade térmica, em seguida, o início dos processos que levam à formação de produtos gasosos. Como o processo de despolimerização e desidratação começam com os grupos hidroxilas da celulose, a silanização com APTES resultou num mascaramento dos grupos -OH, e a consequente transferência desses dois processos para temperaturas ligeiramente mais altas (Isola *et al.*, 2024; Khanjanzadeh *et al.*, 2018). Na DTG, o pico para o APTES ocorre para uma temperatura maior quando comparada às outras amostras (336 °C), porém sua curva de DTG corresponde à metade da intensidade das curvas formadas pelas outras amostras. Este pico principal de degradação para a celulose modificada com o silano APTES pode ser associado a decomposição do grupo amino silano, que estaria sendo enxertado da superfície das fibras nesta faixa de temperatura (Isola *et al.*, 2024).

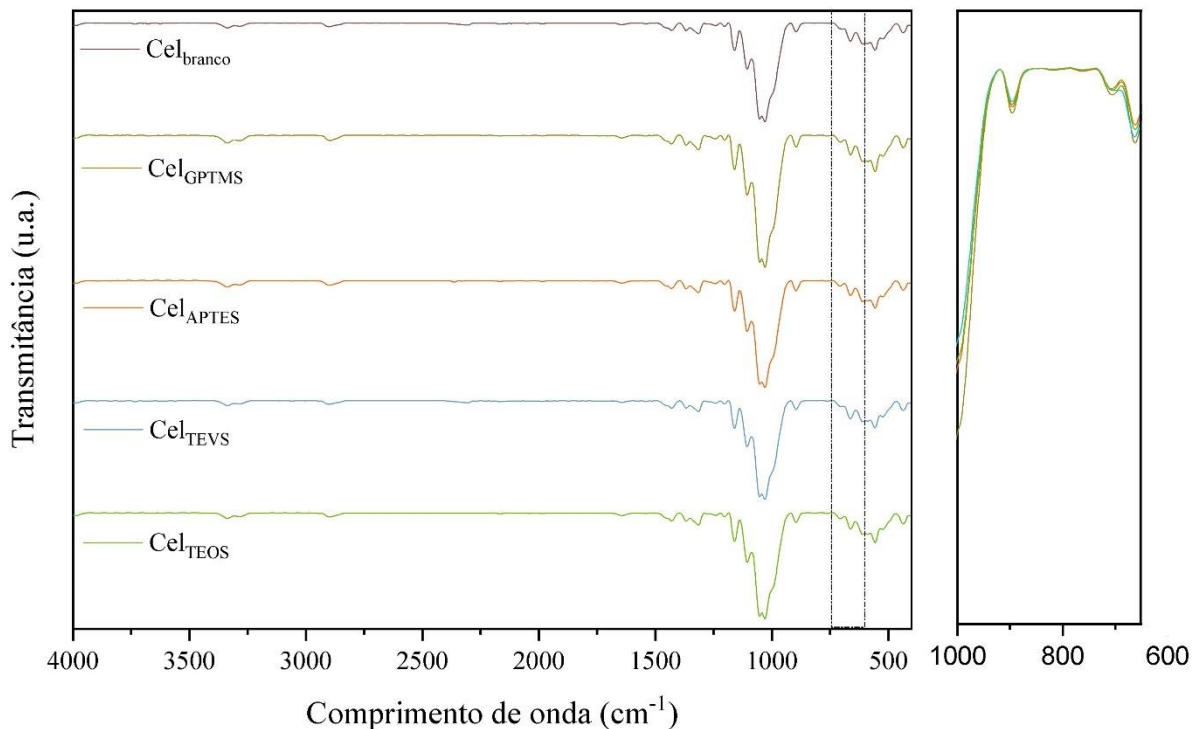
5.2.6 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 18 apresenta os espectros de FTIR dos criogéis de celulose com e sem o processo de silanização, onde é destacada a região de 750 a 550 cm^{-1} . Este recorte corresponde

à região na qual são observadas as bandas mais significativas para os silanos, conforme é possível observar na Figura 19. Todas as amostras analisadas apresentaram comportamentos similares nos espectros de infravermelho, como é possível observar nas bandas obtidas para o intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} . As amostras apresentaram bandas características da celulose, como em 1511 cm^{-1} que corresponde à ligação C-O e indica a presença de pequenas frações de lignina na celulose (Xiao *et al.*, 2015). Entre os comprimentos de onda mais característica da celulose de 3320-3340 cm^{-1} , é registrado o estiramento das ligações O-H presentes entre as fibras. Enquanto que, na banda por volta de 2900 cm^{-1} , ocorre a detecção do estiramento das ligações $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ (Lee *et al.*, 2014; Popescu *et al.*, 2009).

A faixa correspondente à presença dos agentes organosilanos, Si-O-C, ocorre aproximadamente 1135 cm^{-1} é de difícil observação por conta da sobreposição com as bandas C-O-C da celulose (Jing *et al.*, 2022).

Figura 17 - Gráfico contendo as curvas de transmitância obtidas

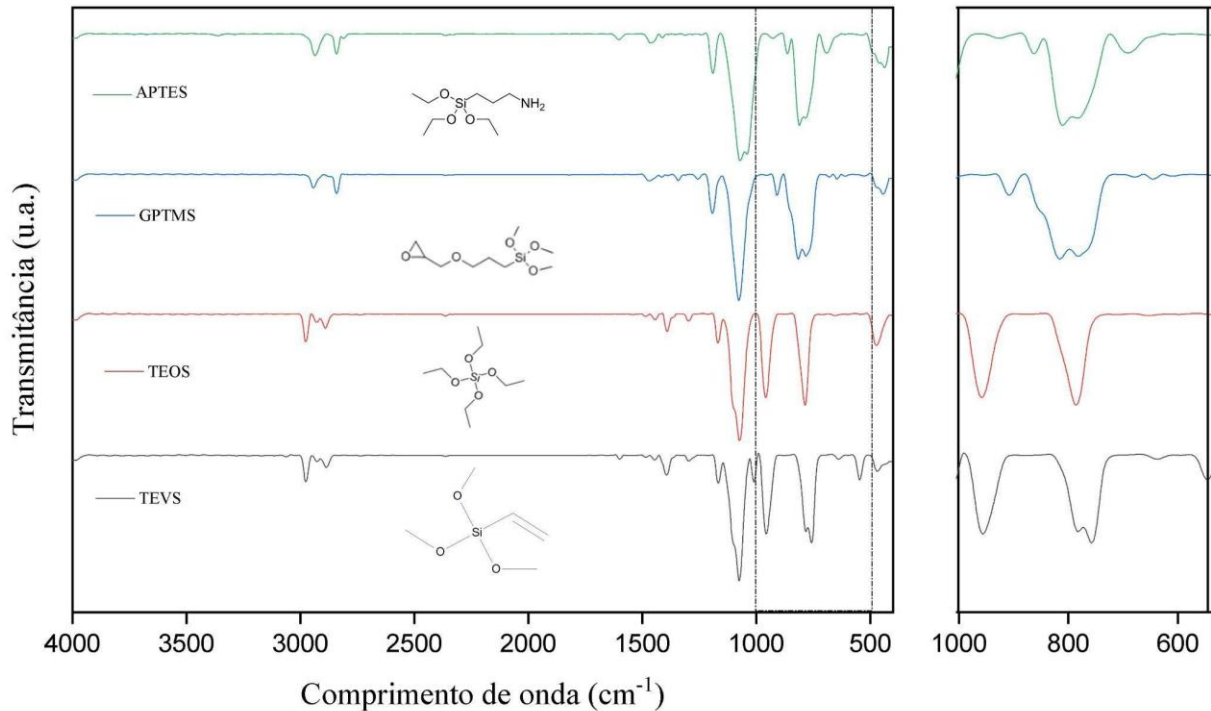


Fonte: Da autora (2025)

Para efeitos de comparação, foi realizado um ensaio de FTIR dos silanos puros (reagentes utilizados para fazer deposição a vapor nos criogéis). A Figura 19 apresenta os espectros de FTIR dos silanos, em que os picos mais significativos para a identificação dos diferentes silanos usados, está presente na faixa destacada de 550-1000 cm^{-1} . Para esta faixa

em todos os silanos, as ligações Si-O-Si apresentam um alongamento assimétrico das suas bandas, a variação dessas bandas entre um silano e outro, se dá pelos diferentes grupos funcionais.

Figura 18 - Espectros de FTIR dos reagentes à base de organosilanos utilizados no processo de deposição a vapor



Fonte: Da autora (2025)

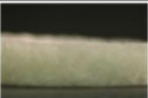

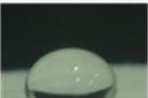
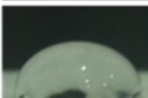
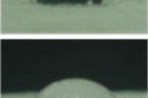
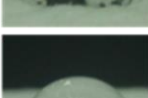


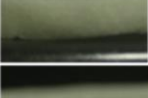
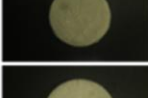
Para o APTES, os picos de aproximadamente 900-1030 cm^{-1} correspondem à banda contendo o estiramento da ligação Si-O. E a presença do grupo aminopropil do APTES está na região espectral de 2800-3200 cm^{-1} (Chang *et al.*, 2013; Majoul; Aouida; Bessaïs, 2015). Quanto ao organosilano GPTMS, na banda de aproximadamente 750 cm^{-1} , tem-se a presença do grupo Si-O-Si (Bahramnia *et al.*, 2022). O TEOS tem todas as ligações do silício associadas a um oxigênio, fazendo com que sua banda mais significativa seja entre 750-1000 cm^{-1} com dois picos representando Si-O e o seu pico de maior transmitância em $\cong 1200 \text{ cm}^{-1}$ (Butts *et al.*, 2020). E por fim, o organosilano TEVS, nos picos de 900-990 apresenta o grupo vinil, o mais significativo para este reagente (Dhali *et al.*, 2022).

5.2.7 Molhabilidade por ângulo de contato

A Tabela 3 apresenta os valores para o ângulo de contato dos criogéis de celulose, com e sem tratamento químico por organosilano. Observa-se que o ensaio de molhabilidade por

ângulo de contato demonstrou que apenas as amostras que passaram pelo tratamento com os silanos APTES e TEVS, apresentaram comportamento classificado como hidrofóbico. Esse caráter hidrofóbico no caso do APTES está relacionado com a presença do grupo alquila nas cadeias das moléculas, que reduzem a presença de grupos hidroxila na superfície, os quais são responsáveis pela formação das ligações com a água (ligação entre grupos polares), e também a reação dos grupos da superfície da celulose com as moléculas de silano do APTES (Fiorilli et al., 2008). Enquanto que o TEVS possui 3 grupos etóxi que interagem com água e com a superfície da celulose por meio de ligações de hidrogênio, porém o grupo de polissiloxano repele os grupos -OH da água, quando aderidos a superfície da celulose. Responsável pela atribuição do comportamento hidrofóbico das amostras revestidas por este silano (Dhali *et al.*, 2022).

Tabela 3 - Molhabilidade por ângulo de contato das amostras

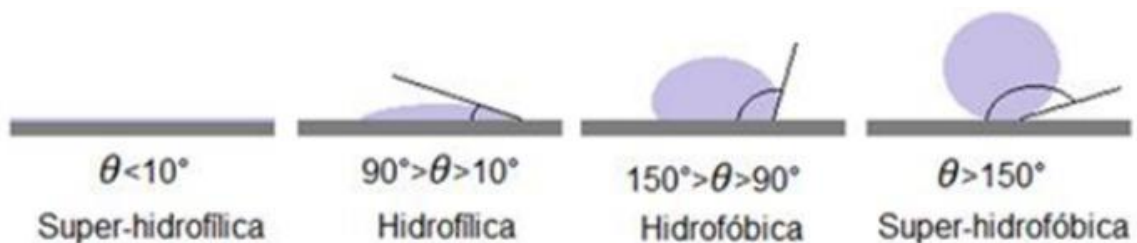
Amostra	t=0	Ângulo	t=5 min	Ângulo
Cel _{branco}		-		-
Cel _{APTES}		103° ± 0,17		100,6° ± 1,3
Cel _{TEVS}		100,8° ± 0,15		100,6° ± 0,19
Cel _{TEOS}		-		-
Cel _{GPTMS}		-		-

Fonte: Da autora (2024).

O comportamento da molhabilidade que define a classificação da hidrofobicidade/hidrofilicidade de amostras está presente na Figura 20. As amostras de Cel_{branco}, Cel_{TEOS} e Cel_{GPTMS} tiveram a absorção instantânea da gota de água aplicada na superfície, classificadas como hidrofílicas. De acordo com o esquema apresentado por Carneiro, Ferreira e Houmard (2018), a definição de hidrofobicidade é dada quando o ângulo de contato de uma amostra permanece acima de 90° por um período de pelo menos 5 minutos. O processo

de silanização pela condensação dos organosilanos, formam uma ligação estável entre o silano e a microfibrila de celulose, alterando suas propriedades de superfície, como a hidrofilicidade ou hidrofobicidade, dependendo do tipo de silano utilizado. Os grupos silanol (Si-OH) formados reagem com os grupos hidroxila (-OH) presentes na celulose, criando ligações covalentes entre o silano e a superfície da fibra, formando pontes de siloxano (Si-O-Celulose) entre o silano e a microfibrila de celulose. A molhabilidade obtida para os criogéis silanizados com TEOS e GPTMS, mesmo que com absorção instantânea durante os ensaios, as amostras absorveram uma quantidade suficiente dos respectivos organosilanos na superfície que permitiu a realização dos posteriores ensaios de viabilidade celular. Em que as amostras não se desintegraram durante a exposição aos fluídos do ensaio (como acontece com a celulose sem tratamento), e também não flutuaram sobre o fluído (como ocorre com as amostras silanizadas com TEVS e APTES), tornando-as ideais para a aplicação neste aspecto.

Figura 19 - Esquema de classificação de hidrofobicidade conforme o ângulo de contato



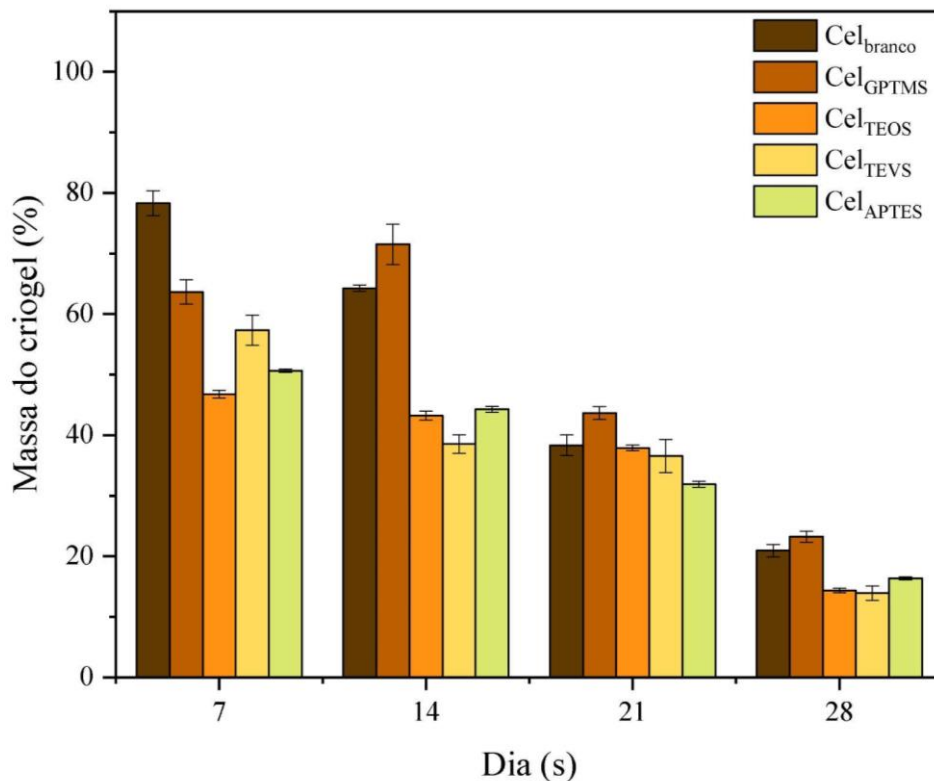
Fonte: Carneiro, Ferreira, Houmard (2018)

5.2.8 Degradação em fluido corporal simulado (*SBF - simulated body fluid*)

O fluido corporal simulado, pode ser empregado para observar diferentes comportamentos em biomateriais. O ensaio de absorção de fluido corporal simulado foi realizado ao longo de 28 dias, contando com pesagens e trocas de fluido a cada 2 dias. A absorção do fluido corporal simulado foi obtida a partir da realização de pesagens nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias, com essa massa, foi possível calcular o percentual de perda de massa nesse período, conforme apresentado na Figura 21. Na primeira pesagem, os *scaffolds* incharam após o contato com o SBF e o peso dos materiais aumentou significativamente. O inchaço causou o enfraquecimento das paredes dos poros e o amolecimento dos criogéis. Ao final do período do ensaio, as amostras se degradaram significativamente no fluido, com uma perda de massa superior a 80 %. Além disso, os desvios padrão obtidos para cada medição se

mantiveram baixos, apenas na amostra Cel_{GPTMS} para o dia 14 tem-se um ganho de massa, e um consequente desvio padrão maior. Os estudos de He et al., (2018), trouxeram a avaliação da perda de massa em SBF para *scaffolds* de colágeno e hidroxiapatita com incorporação de celulose microfibrilada, em que constatou-se que a taxa de degradação aumentava significativamente com o aumento de celulose na composição, com uma porcentagem de degradação de 50-70 % para as 6 semanas avaliadas.

Figura 20 - Variação da massa (%) dos criogéis degradados em SBF



Fonte: Da autora (2025)

Essa degradação é um indicativo da biocompatibilidade dos criogéis de celulose com o plasma sanguíneo humano. Para *scaffolds* de matriz extracelular, este estudo prevê a degradabilidade desse material quando em contato com fluídos para a cultura celular. Enquanto para *scaffolds* construídos com o intuito de aplicar diretamente no organismo, como os estudos de Horvat et al., (2024), permite prever a estabilidade deste dispositivo ao longo do tempo.

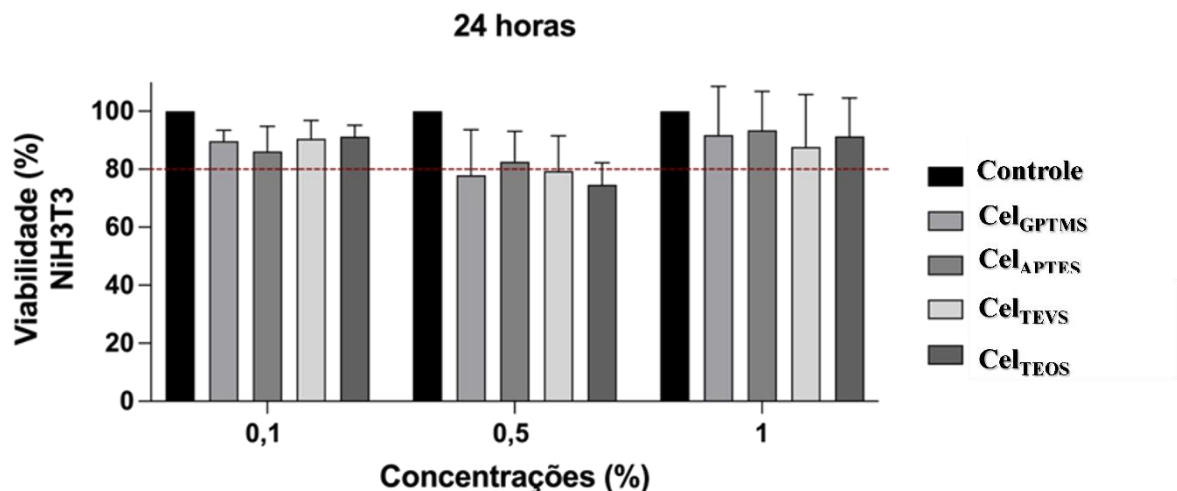
5. 2. 9 Viabilidade celular

5. 2. 9.1 Viabilidade celular com células NiH3T3

A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT, após as células (NiH3T3) serem incubadas com as amostras de celulose (Cel_{GPTMS}; Cel_{APTES}; Cel_{TEVS} e Cel_{TEOS}) por 24, 48 e 72 horas. Este ensaio de citotoxicidade, foi feito com os criogéis em pedaços e em suspensão com água ultrapura tipo 1. Os resultados do ensaio de MTT são apresentados nas Figuras 22, 23 e 24. Observa-se que todas as amostras de celulose testadas não apresentaram citotoxicidade para a linhagem celular NiH3T3. Em todas as concentrações e períodos de incubação avaliados, as amostras mantiveram uma viabilidade celular superior a 80%. Esses achados sugerem que as amostras de celulose são biocompatíveis e não prejudicam a sobrevivência celular sobre as condições experimentais utilizadas. A norma ISO 10993-5, fornece diretrizes para a avaliação da citotoxicidade de materiais médicos em contato com células vivas. De acordo com essa norma, um material é considerado citotóxico se provocar uma redução na viabilidade celular maior que 70%. Este valor é um indicador significativo de toxicidade, sinalizando que o material pode causar danos consideráveis às células.

No tempo de 24 horas de ensaio para uma concentração de 0,5 do meio preparado, houve uma pequena redução abaixo da linha de 80 % de viabilidade. Em que por desvio padrão, as amostras ainda estão dentro desta margem de viabilidade, conseqüentemente, não apresentando citotoxicidade. A viabilidade com células NiH3T3, não foi testada para a amostra não silanizada, Cel_{branco}.

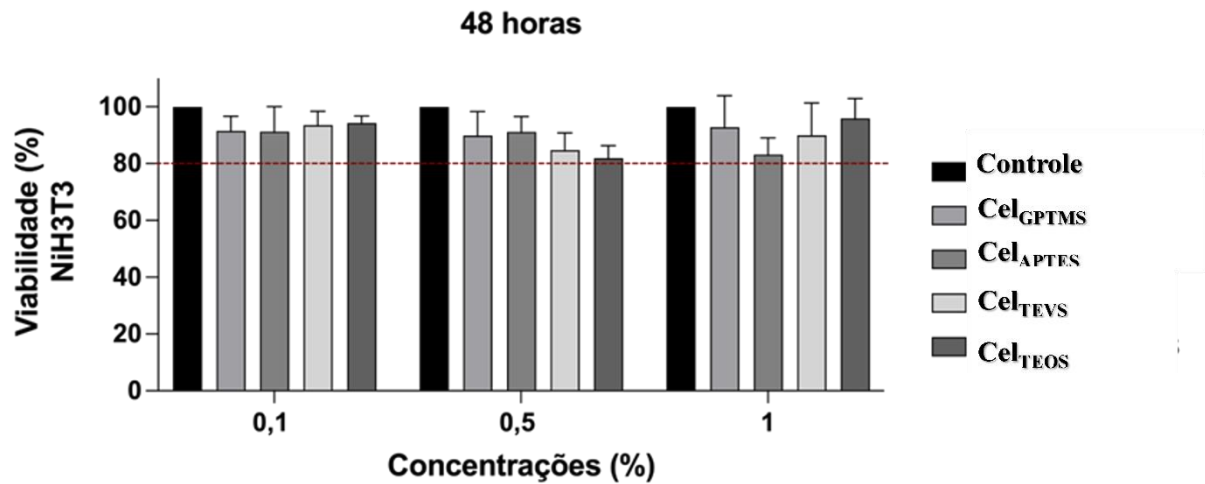
Figura 21 - Efeito das amostras de Cel_{GPTMS}; Cel_{APTES}; Cel_{TEVS} e Cel_{TEOS} sobre a viabilidade celular de células imortalizadas de fibroblastos murinos (NiH3T3) após 24 horas de exposição



Os experimentos foram realizados em dias alternados e em triplicata. Dados expressos como média \pm desvio padrão, considerando $p \leq 0,05$ como significativo (two-way ANOVA).

Como é possível observar na Figura 23, no período de incubação de 48 horas, todas as amostras de criogéis em suspensão mantiveram a sua percentagem de viabilidade celular em 80%, ou ainda acima desta quantia.

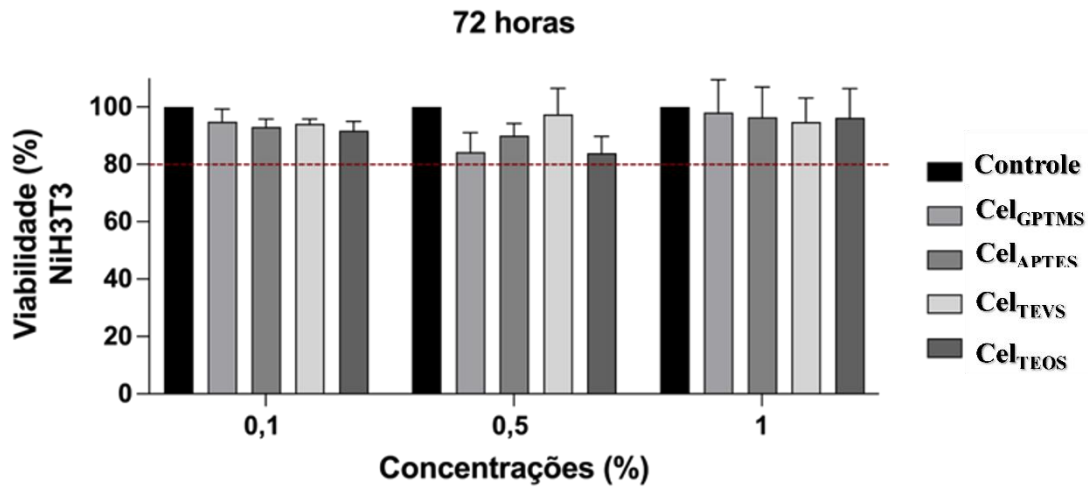
Figura 22 - Efeito das amostras de Cel_{GPTMS}; Cel_{APTES}; Cel_{TEVS} e Cel_{TEOS} sobre a viabilidade celular de células imortalizadas de fibroblastos murinos (NIH3T3) após 48 horas de exposição.



Os experimentos foram realizados em dias alternados e em triplicata. Dados expressos como média \pm desvio padrão, considerando $p \leq 0,05$ como significativo (two-way ANOVA).

Conforme ilustra a Figura 24 para as 72 horas, o último período avaliado, a viabilidade celular permaneceu acima de 80 % para todas as amostras testadas e nas diferentes concentrações. Demonstrando que com o aumento do período de exposição dos criogéis às células de análise, não houve redução do percentual de viabilidade celular, e as células puderam se proliferar em contato com o material.

Figura 23 - Efeito das amostras de Cel_{GPTMS}; Cel_{APTES}; Cel_{TEVS} e Cel_{TEOS} sobre a viabilidade celular de células imortalizadas de fibroblastos murinos (NiH3T3) após 72 horas de exposição.



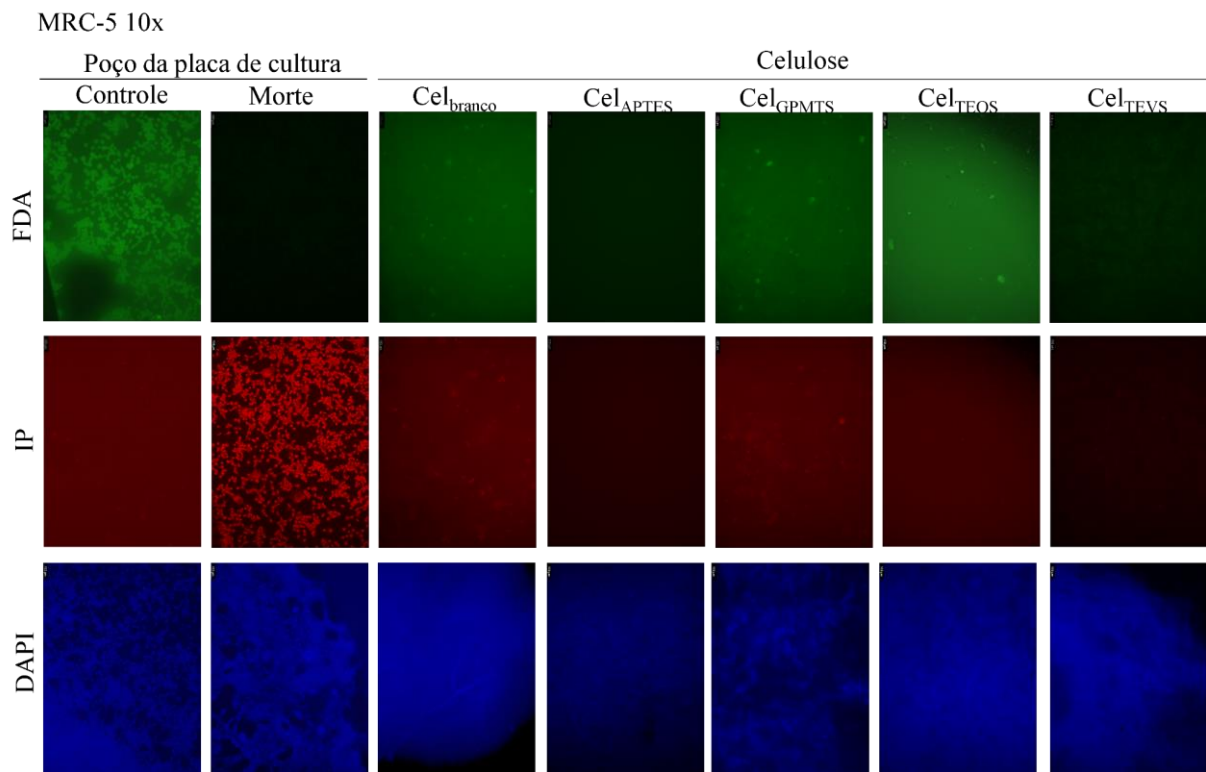
Os experimentos foram realizados em dias alternados e em triplicata. Dados expressos como média \pm desvio padrão, considerando $p \leq 0,05$ como significativo (two-way ANOVA).

5. 2. 9. 2 Viabilidade celular para as células MRC-5 e PC-12

Os criogéis tratados com os silanos APTES e TEVS demonstraram maior hidrofobicidade e devido a isto, o meio de cultura contendo as células não teve contato com o material. Estas amostras permaneceram flutuando no líquido e as células se aderiram ao fundo do poço, não sendo observadas células nesses grupos experimentais após coloração fluorescente nem efeito na viabilidade quantificada por MTT. A microscopia de fluorescência após 24 horas de adesão dos materiais é apresentada na Figura 25 referente às células MRC-5. Nos poços controle é possível visualizar muitas células vivas coradas por FDA (Fluoresceína diacetato) e algumas mortas por IP (Iodeto de propídio); no grupo experimental de “Morte”, somente células mortas coradas em vermelho são observadas. Células vivas podem ser detectadas marcadas de verde e mortas em vermelho nos grupos Cel_{branco}, Cel_{GPTMS} e Cel_{TEOS}. Os núcleos das células aderidas nos diferentes grupos estudados são visíveis em azul. Devido a tridimensionalidade dos criogéis, é possível observar um aspecto borrado nas imagens e as células parecem escassas pois estão dispersas em diferentes níveis. A hidroflicidade da celulose microfibrilada promove a adsorção das proteínas necessárias para o cultivo, e facilita a aderência das células, e a camada superficial dos silanos GPTMS e TEOS que revestiu os criogéis manteve a estrutura intacta, sem que se dissolvesse no meio durante o tempo necessário para o ensaio.

Além disso, a boa viabilidade e aderência celular observada nos criogéis de celulose pode ser atribuída a combinação da micro- e nanoestrutura que imitam a matriz extracelular e criam pontos de fixação para as células, aumentando a aderência e a proliferação celular (Ghafari *et al.*, 2019). A Figura 25 apresenta imagens de microscopia de fluorescência dos ensaios de adesão de células MRC-5 24 horas após a semeadura. As células foram submetidas ao ensaio do tipo *Live/dead* com FDA (fluoresceína diacetato marcando células vivas em verde), IP (iodeto de propídio corando as mortas em vermelho) e os núcleos das células corados com DAPI (dicloridrato de 4',6-diamidina-2'-fenilindol) em azul. Aumento de 100x, com barra de escala de 100 μm . O controle corresponde às células cultivadas diretamente nos poços da placa de cultura e controle de morte às células mortas com etanol.

Figura 24 - Imagens de microscopia de fluorescência para as células MRC-5

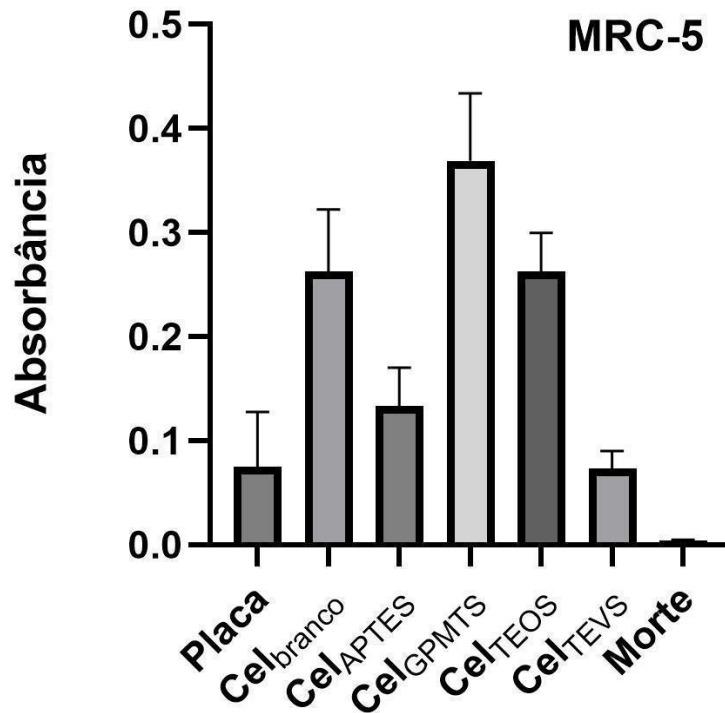


Fonte: Da autora (2024)

A Figura 26 apresenta os resultados da avaliação da viabilidade das células MRC-5 cultivadas por 1 dia diretamente nos materiais (MTT direto). Esse ensaio baseia-se na capacidade das células metabolicamente ativas de converter o MTT em formazan, resultando em uma leitura de absorvância diretamente proporcional ao número de células viáveis. Para as

células de MRC-5 os criogéis de GPTMS obtiveram maior absorvância quando comparados às outras amostras testadas.

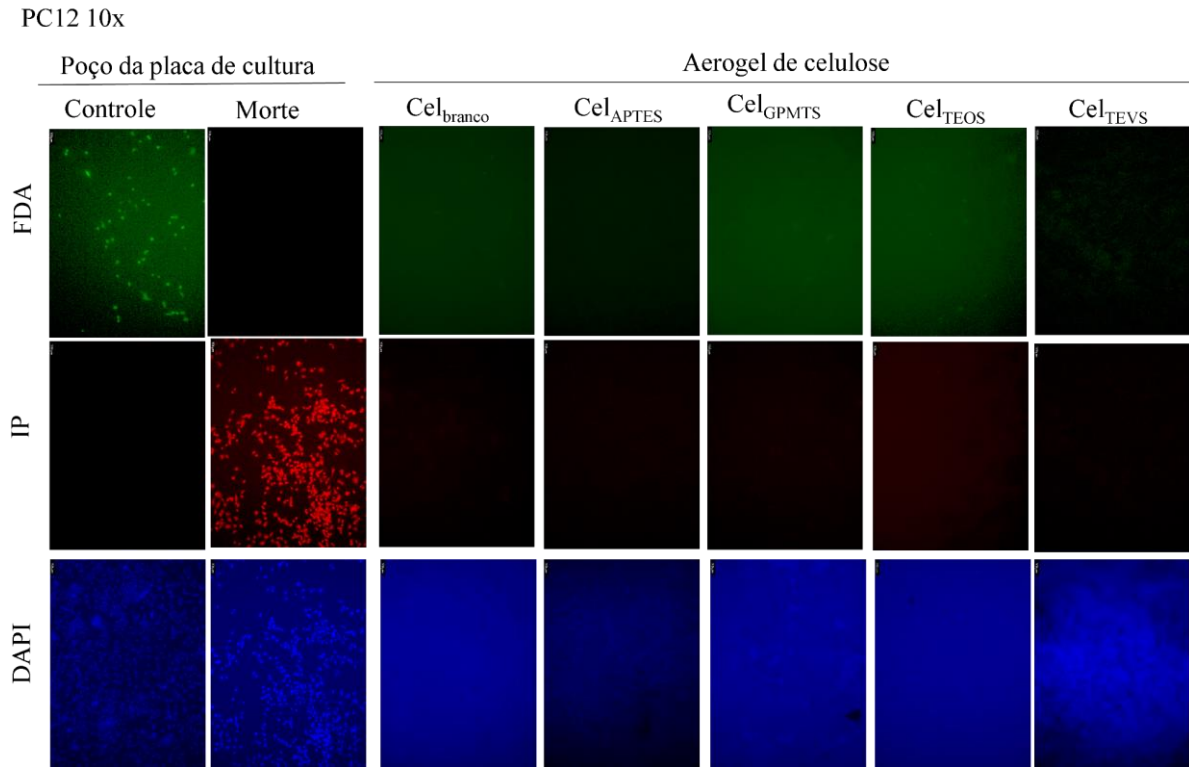
Figura 25 - Viabilidade celular medida por absorvância com células de MRC-5



Fonte: Da autora (2025)

Referente às células PC-12, similarmente as MRC-5, devido à natureza 3D dos *scaffolds*, as imagens de microscopia ficaram desfocadas. As imagens de microscopia de fluorescência dos ensaios de adesão de células PC-12 24 horas após a semeadura, estão presentes na Figura 27. Assim como nas células MRC-5, as células de PC-12 também foram submetidas ao ensaio do tipo Live/dead com FDA, IP e os núcleos das células corados com DAPI em azul, para um aumento de 100x, com barra de escala de 100 μm . E o controle corresponde às células cultivadas diretamente nos poços da placa de cultura e controle de morte às células mortas com etanol.

Figura 26 - Imagens de microscopia de fluorescência para as células PC-12



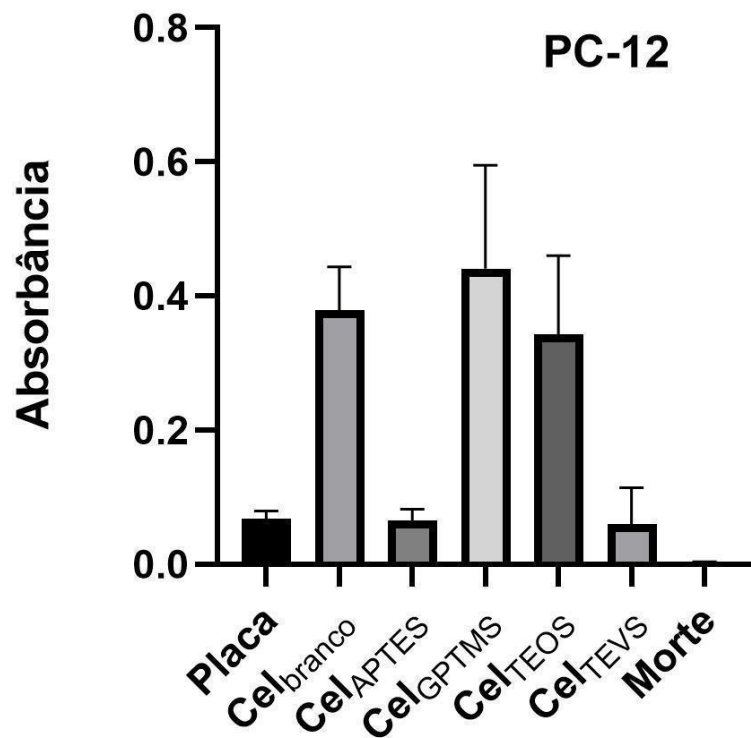
Fonte: Da autora (2025)

Na Figura 28, pode-se observar que as amostras de criogéis Cel_{branco}, Cel_{GPMTS} e Cel_{TEOS} apresentaram os maiores valores de absorvância, significativamente diferentes do grupo controle (células aderidas diretamente na placa de cultura), indicando um maior número de células viáveis nessas condições. Estes resultados sugerem que esses tratamentos não foram citotóxicos para as células PC-12, e promoveram sua viabilidade. Em contraste, os grupos placa Cel_{APTES}, Cel_{TEVS} e morte apresentaram menores valores de absorvância, com diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos de maior viabilidade, indicando redução da viabilidade celular. É possível observar que a viabilidade celular nos grupos experimentais Cel_{APTES} e Cel_{TEVS} foi similar à da placa de cultura. Esses materiais provavelmente não continham células devido à hidrofobicidade e a absorvância detectada se refere às células aderidas ao fundo do poço, resultado que indica que os materiais não liberam compostos tóxicos que poderiam matar as células. O controle de morte (Triton) apresentou citotoxicidade, com redução da absorvância maior do que 70%, tendo viabilidade celular de 2%. Na Figura 28, é possível verificar o ensaio de viabilidade (MTT) direto de PC-12 após 24 horas. “Placa” corresponde às células cultivadas diretamente nas placas de cultura e morte representa controle

de morte (células tratadas com 1% de Triton X-100 por 10 minutos imediatamente antes do MTT). Dados expressos em média e erro padrão médio.

As amostras de Cel_{branco}, Cel_{GPTMS} e Cel_{TEOS} além de não apresentarem citotoxicidade, exibiram aderência celular, tornando viável o crescimento e a proliferação de células nestes *scaffolds*. A viabilidade celular medida por absorbância para as células de PC-12 com análise de 24 horas está presente na Figura 28. A boa viabilidade e aderência celular é novamente observada, para as células PC-12, com uma absorbância ligeiramente maior (acima de 0,4 para a amostra Cel_{GPTMS}) que a encontrada com a MRC-5.

Figura 27 - Viabilidade celular de células PC-12 após 24 horas de exposição



Fonte: Da autora (2024)

Alguns estudos foram feitos para avaliar a viabilidade celular da celulose microfibrilada para cultura celular. Alexandrescu et al., (2013), testou a citotoxicidade com células de fibroblastos da linhagem 3T3-L1, a celulose com secagem por liofilização e com ou sem funcionalização por TEMPO (radical 1-oxi de 2,2,6,6-tetrametilpiperidina). Seus resultados apontaram que a membrana celular, a atividade mitocondrial e a proliferação de DNA permaneceram inalteradas durante os testes, que envolveram contato direto e indireto entre a

celulose e as células 3T3. Resultado similar ao encontrado com a celulose microfibrilada com e sem revestimento com organosilanos.

Tendo em vista que um *scaffold* ideal deve proporcionar a adesão das células, permitir a propagação ou migração e produzir uma matriz extracelular semelhante à sua condição nativa (Badekila; Kini; Jaiswal, 2021). Os criogéis de celulose obtidos tiveram a propagação celular constatada pelos valores de absorvância obtidas nas amostras de Cel_{branco}, Cel_{GPTMS} e Cel_{TEOS}. Permitiram a fixação celular, conforme o ensaio de DAPI, em que os núcleos das células coradas em azul se destacaram na microscopia de fluorescência. E a sua matriz de teias fibrosas com microporos garantiu a semelhança com a condição nativa necessária para as células.

Apesar da possível variabilidade na composição, os *scaffolds* orgânicos de origem natural (como o alginato, a quitosana, o colágeno, e a celulose) favorecem pelas suas estruturas que podem imitar o tecido original, auxiliando na sua fixação e na sua biocompatibilidade. Os resultados obtidos para os *scaffolds* com base em criogéis de celulose estão próximos ou iguais aos obtidos para outros biomateriais naturais (Courtenay *et al.*, 2017).

A substituição dos modelos tradicionais de cultivo celular, por cultura celular 3D, como o modelo dos criogéis de celulose, é viável e traz diversas vantagens. Permitindo a proliferação e formação de tecidos em ambientes favoráveis e adaptáveis para a necessidade dos diferentes tipos de células. Além disso, a maior representação fisiológica, e uma maior interação entre as células, evita a monocultura (crescimento desordenado e de pouca interação), comum aos modelos de placa de poliestireno. A arquitetura celular mais realista perante o organismo, se destaca quando comparada aos modelos *in vivo*, podendo então vir a substituir os testes em animais. Os criogéis de celulose silanizados, podem ter sua estrutura e os seus tamanhos de poros adaptados de acordo com a célula cultivada, contando com uma boa compatibilidade com as células, estes também oferecem vantagens econômicas, por ser uma matéria prima renovável e abundante.

6. CONCLUSÃO

A celulose produzida por desfibrilação mecânica foi adequada para a construção dos *scaffolds*. Em que a celulose, apresentou uma redução de 36 % no seu grau de polimerização (GP) e uma redução no índice de cristalinidade (IC), de aproximadamente 10,9 % após o processamento mecânico. O criogel de celulose microfibrilada seco em liofilizador e silanizado por deposição a vapor para cultura celular, foi obtido de maneira efetiva. A análise morfológica indicou a presença em destaque de microfibras de celulose, com a formação de algumas teias de nanocelulose.

A porosidade dos criogéis permaneceu na faixa de 98-99 %, característico para este material. A porosidade do material, permitiu a realização de ensaios que viabilizam o possível uso do mesmo como *scaffold* para crescimento e proliferação em matriz extracelular. A viabilidade celular do material se manteve acima de 80 % em todas as amostras testadas, para o ensaio realizado nas amostras em suspensão. Enquanto que para os criogéis estruturados na forma de discos, a hidrofobicidade dos materiais silanizados com APTES e TEVS não permitiu o cultivo das células, já que estas não conseguiram aderir ao material para poder se desenvolver, e se depositaram no ao fundo dos poços testados. Essa hidrofobicidade foi confirmada também, no ensaio de molhabilidade por ângulo de contato, em que as amostras contendo APTES e TEVS formaram ângulos os quais indicavam hidrofobicidade (acima de 90 °).

Com isso é possível afirmar que os melhores *scaffolds* obtidos foram aqueles contendo os silanos TEOS e GPTMS. Em que a boa viabilidade celular é atribuída a estrutura micro e nano da celulose que criam pontos de fixação adequados para a aderência e a proliferação celular. Assim, os criogéis de celulose silanizados têm potencial para atuar como matriz extracelular para o cultivo de diferentes tipos de células e formação de tecidos, substituindo a cultura tradicional de células animais em 2D que implementa frascos de poliestireno, e também o uso de sistemas animais completos. Contudo, é necessário a realização de mais testes *in vitro* por períodos de tempo superiores e que constatem a formação de tecidos nessa matriz.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Uso de outros tipos de celulose, como a celulose bacteriana e a microcristalina para a construção dos *scaffolds*;
- Realização de outros tipos de secagem, por secador supercrítico ou ainda por evaporação lenta de solventes a temperatura controlada;
- Outros ensaios *in vitro* que atestem o comportamento do criogel de celulose como *scaffolds* para cultivo em matrix extracelular;
- Teste de acompanhamento da formação de novos tecidos sobre os *scaffolds* produzidos, por um período de tempo superior a 24 horas;

REFERÊNCIAS

ABDUL KHALIL, H. P. S. *et al.* Insights into the Role of Biopolymer-Based Xerogels in Biomedical Applications. **Gels**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 334, 2022.

AKBARI, Soheil *et al.* Next-Generation Liver Medicine Using Organoid Models. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 7, 2019.

AKTI, Filiz; BALCI, Suna. Silica xerogel and iron doped silica xerogel synthesis in presence of drying control chemical additives. **Materials Chemistry and Physics**, [s. l.], v. 297, p. 127347, 2023.

ALEXANDRESCU, Laura *et al.* Cytotoxicity tests of cellulose nanofibril-based structures. **Cellulose**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 1765–1775, 2013.

BADEKILA, Anjana K.; KINI, Sudarshan; JAISWAL, Amit K. Fabrication techniques of biomimetic scaffolds in three-dimensional cell culture: A review. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 236, n. 2, p. 741–762, 2021.

BAHRAMNIA, Hamed *et al.* The Effect of 3-(Glycidloxy Propyl) Trimethoxy Silane Concentration on Surface Modification of SiO₂ Nanoparticles. **Silicon**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 4969–4977, 2022.

BÉDARD, Patrick *et al.* Innovative Human Three-Dimensional Tissue-Engineered Models as an Alternative to Animal Testing. **Bioengineering**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 115, 2020.

BENAD, Albrecht *et al.* Mechanical Properties of Metal Oxide Aerogels. **Chemistry of Materials**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 145–152, 2018.

BRUŽAUSKAITĖ, Ieva *et al.* Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes—different cell effects. **Cytotechnology**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 355–369, 2016.

BUTTS, Danielle M. *et al.* Engineering mesoporous silica for superior optical and thermal properties. **MRS Energy & Sustainability**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 39, 2020.

CHANG, Boon Peng *et al.* Abrasive wear performance and antibacterial assessment of untreated and treated ZnO-reinforced polymer composite. **Polymer Composites**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 1020–1032, 2013.

CHENG, Wanke *et al.* Sustainable cellulose and its derivatives for promising biomedical applications. **Progress in Materials Science**, [s. l.], v. 138, p. 101152, 2023.

CHOI, Hanseul *et al.* Synthesis of High Surface Area TiO₂ Aerogel Support with Pt Nanoparticle Catalyst and CO Oxidation Study. **Catalysis Letters**, [s. l.], v. 148, n. 5, p. 1504–1513, 2018.

CIFTCI, Deniz *et al.* Lupin hull cellulose nanofiber aerogel preparation by supercritical CO₂ and freeze drying. **The Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 127, p. 137–145, 2017.

COURTENAY, James C. *et al.* Surface modified cellulose scaffolds for tissue engineering. **Cellulose**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 253–267, 2017.

DE ROSA, Igor Maria *et al.* Effect of chemical treatments on the mechanical and thermal behaviour of okra (*Abelmoschus esculentus*) fibres. **Composites Science and Technology**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 246–254, 2011.

DE SÁ, Patrícia Amorim. **Utilização de engenharia de tecidos no tratamento de feridas crônicas**. 2015. - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2015.

DE-PIERI, Ellen *et al.* DAP1-2: a synthetic peptide targeting IL-1R1 receptor effectively suppresses IL-1 β in vitro. **Immunologic Research**, [s. l.], v. 72, n. 4, p. 788–796, 2024.

DHALI, Kingshuk *et al.* Surface modification of the cellulose nanocrystals through vinyl silane grafting. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 200, p. 397–408, 2022.

DHANDAYUTHAPANI, Brahatheeswaran *et al.* Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. **International Journal of Polymer Science**, [s. l.], v. 2011, p. 1–19, 2011.

DONNALOJA, Francesca *et al.* Natural and Synthetic Polymers for Bone Scaffolds Optimization. **Polymers**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 905, 2020.

EVERETT, D. H. Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 577–638, 1972.

FIORILLI, S. *et al.* Vapor-phase self-assembled monolayers of aminosilane on plasma-activated silicon substrates. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 321, n. 1, p. 235–241, 2008.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**. 7. ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2016.

GARCÍA-GONZÁLEZ, C.A. *et al.* Supercritical drying of aerogels using CO₂: Effect of extraction time on the end material textural properties. **The Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 66, p. 297–306, 2012.

GARCÍA-TORRES, B.A. *et al.* Synthesis of silica aerogels microspheres prepared by ink jet printing and dried at ambient pressure without surface hydrophobization. **Materials Chemistry and Physics**, [s. l.], v. 172, p. 32–38, 2016.

GESSER, H. D.; GOSWAMI, P. C. Aerogels and related porous materials. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 89, n. 4, p. 765–788, 1989.

GHAFAARI, Robab *et al.* Fabrication and characterization of novel bilayer scaffold from nanocellulose based aerogel for skin tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 136, p. 796–803, 2019.

- GORGOLIS, George; GALIOTIS, Costas. Graphene aerogels: a review. **2D Materials**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 032001, 2017.
- HAAFIZ, M.K. Mohamad *et al.* Isolation and characterization of cellulose nanowhiskers from oil palm biomass microcrystalline cellulose. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 103, p. 119–125, 2014.
- HE, Xichan *et al.* Incorporation of microfibrillated cellulose into collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 115, p. 385–392, 2018.
- HORVAT, Gabrijela *et al.* Reinforcing ethyl cellulose aerogels with poly(lactic acid) for enhanced bone regeneration. **Cellulose**, [s. l.], v. 31, n. 7, p. 4421–4439, 2024.
- HU, Yang; CATCHMARK, Jeffrey M. In vitro biodegradability and mechanical properties of bioabsorbable bacterial cellulose incorporating cellulases. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 2835–2845, 2011.
- HUSSEY, George S.; DZIKI, Jenna L.; BADYLAK, Stephen F. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. **Nature Reviews Materials**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 159–173, 2018.
- IDUMAH, Christopher Igwe. Novel advancements in xerogel polymeric nanoarchitectures and multifunctional applications. **Journal of Porous Materials**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 1597–1615, 2023.
- INNERLOHINGER, Josef; WEBER, Hedda K.; KRAFT, Gregor. Aerocellulose: Aerogels and Aerogel-like Materials made from Cellulose. **Macromolecular Symposia**, [s. l.], v. 244, n. 1, p. 126–135, 2006.
- ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**; . [S. l.: s. n.], 2009.
- ISO 23317. **Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials**. [S. l.: s. n.], 2020.
- ISOGAI, Akira. Cellulose Nanofibers: Recent Progress and Future Prospects. **Journal of Fiber Science and Technology**, [s. l.], v. 76, n. 10, p. 310–326, 2020.
- ISOLA, Mattia *et al.* Thermal properties and decomposition products of modified cotton fibers by TGA, DSC, and Py–GC/MS. **Polymer Degradation and Stability**, [s. l.], v. 228, p. 110937, 2024.
- JAFARI, Maissa *et al.* Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, [s. l.], v. 105, n. 2, p. 431–459, 2017.
- JIANG, Shuai *et al.* Cellulose nanofibril (CNF) based aerogels prepared by a facile process and the investigation of thermal insulation performance. **Cellulose**, [s. l.], v. 27, n. 11, p. 6217–6233, 2020.

JIN, Chunde *et al.* Fabrication of cellulose-based aerogels from waste newspaper without any pretreatment and their use for absorbents. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 123, p. 150–156, 2015.

JING, Mengfan *et al.* Markedly improved hydrophobicity of cellulose film via a simple one-step aminosilane-assisted ball milling. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 275, p. 118701, 2022.

KARANDE, V. S. *et al.* Nanofibrillation of cotton fibers by disc refiner and its characterization. **Fibers and Polymers**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 399–404, 2011.

KHANJANZADEH, Hossein *et al.* Surface chemical functionalization of cellulose nanocrystals by 3-aminopropyltriethoxysilane. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 106, p. 1288–1296, 2018.

KOO, Bon-Kyoung; HUCH, Meritxell. Organoids: A new in vitro model system for biomedical science and disease modelling and promising source for cell-based transplantation. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 420, n. 2, p. 197–198, 2016.

LANZA, Robert; LANGER, Robert; VACANTI, Joseph P. **Principles of Tissue Engineering**. 2. ed. Londres: Elsevier, 2007.

LAZZARI, Lídia K. *et al.* Sorption capacity of hydrophobic cellulose cryogels silanized by two different methods. **Cellulose**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 3421–3431, 2017.

LEE, Jin-Ah *et al.* Preparation and characterization of cellulose nanofibers (CNFs) from microcrystalline cellulose (MCC) and CNF/polyamide 6 composites. **Macromolecular Research**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 738–745, 2014.

LIU, Kun *et al.* Recent advances in cellulose and its derivatives for oilfield applications. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 259, p. 117740, 2021.

LIU, C.; XIA, Z.; CZERNUSZKA, J.T. Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. **Chemical Engineering Research and Design**, [s. l.], v. 85, n. 7, p. 1051–1064, 2007.

LONG, Lin-Yu; WENG, Yun-Xuan; WANG, Yu-Zhong. Cellulose Aerogels: Synthesis, Applications, and Prospects. **Polymers**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 623, 2018.

LUO, Huize *et al.* Advances in tissue engineering of nanocellulose-based scaffolds: A review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 224, p. 115144, 2019.

LYNCH, Kyle J; SKALLI, Omar; SABRI, Firouzeh. Growing Neural PC-12 Cell on Crosslinked Silica Aerogels Increases Neurite Extension in the Presence of an Electric Field. **Journal of Functional Biomaterials**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 30, 2018.

MAHFOUDHI, Norhene; BOUFI, Sami. Nanocellulose as a novel nanostructured adsorbent for environmental remediation: a review. **Cellulose**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 1171–1197, 2017.

- MAJOUL, N.; AOUIDA, S.; BESSAÏS, B. Progress of porous silicon APTES-functionalization by FTIR investigations. **Applied Surface Science**, [s. l.], v. 331, p. 388–391, 2015.
- MATOVIĆ, B. *et al.* Carbon cryogel preparation and characterization. **Diamond and Related Materials**, [s. l.], v. 121, p. 108727, 2022.
- MAURMANN, Natasha *et al.* Mesenchymal stem cells cultivated on scaffolds formed by 3D printed PCL matrices, coated with PLGA electrospun nanofibers for use in tissue engineering. **Biomedical Physics & Engineering Express**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 045005, 2017.
- MAYS, TJ. A new classification of pore sizes. *In: [S. l.: s. n.]*, 2007. p. 57–62.
- METI, Puttavva *et al.* Overview of organic–inorganic hybrid silica aerogels: Progress and perspectives. **Materials & Design**, [s. l.], v. 222, p. 111091, 2022.
- MIRTAGHAVI, Ali; LUO, Jikui; MUTHURAJ, Rajendran. Recent Advances in Porous 3D Cellulose Aerogels for Tissue Engineering Applications: A Review. **Journal of Composites Science**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 152, 2020.
- MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- NGUYEN, Son T. *et al.* Advanced thermal insulation and absorption properties of recycled cellulose aerogels. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 445, p. 128–134, 2014.
- NITA, Loredana Elena *et al.* New Trends in Bio-Based Aerogels. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 449, 2020.
- PAN, H; JIANG, H; CHEN, W. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-co-glycolide. **Biomaterials**, [s. l.], v. 27, n. 17, p. 3209–3220, 2006.
- PARK, Jong-Hee; SUDARSHAN, T. S. **Chemical vapor deposition** . [S. l.: s. n.], 2001. v. 2
- PENG, Yucheng *et al.* Influence of drying method on the material properties of nanocellulose I: thermostability and crystallinity. **Cellulose**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 2379–2392, 2013.
- PIERRE, Alain C. History of Aerogels. *In: AEROGELS HANDBOOK*. . Nova Iorque: Springer, 2011. p. 3–18.
- PIERRE, Alain C.; PAJONK, Gérard M. Chemistry of Aerogels and Their Applications. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 102, n. 11, p. 4243–4266, 2002.
- PIRES, Ana Luiza R; BIERHALZ, Andréa C. K.; MORAES, Ângela M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química nova**, [s. l.], v. 38, p. 957–971, 2015.

PLIEVA, Fatima M. *et al.* Cryogel applications in microbiology. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 543–551, 2008.

POPESCU, Carmen-Mihaela *et al.* Vibrational spectroscopy and X-ray diffraction methods to establish the differences between hardwood and softwood. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 77, n. 4, p. 851–857, 2009.

ROCHA CANELLA CARNEIRO, Andreia; DE SOUZA FERREIRA, Fábio Augusto; HOUMARD, Manuel. Easy functionalization process applied to develop super-hydrophobic and oleophobic properties on ASTM 1200 aluminum surface. **Surface and Interface Analysis**, [s. l.], v. 50, n. 12–13, p. 1370–1383, 2018.

SABRI, Firouzeh *et al.* Histological Evaluation of the Biocompatibility of Polyurea Crosslinked Silica Aerogel Implants in a Rat Model: A Pilot Study. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. e50686, 2012.

SABRI, Firouzeh *et al.* Investigation of crosslinked silica aerogels for implant applications. *In:* , 2011. **Proceedings of the 2011 Biomedical Sciences and Engineering Conference: Image Informatics and Analytics in Biomedicine**. [S. l.]: IEEE, 2011. p. 1–3.

SCUSSEL, Rahisa *et al.* Ecotoxic, genotoxic, and cytotoxic potential of leachate obtained from chromated copper arsenate-treated wood ashes. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 29, n. 27, p. 41247–41260, 2022.

SEDDIQI, Romal; KAMAL, Mohammad Ibrahim; YOUSUFI, Hashmatullah. Prevalence of Renal Cell Carcinoma in Samples Sent to the Pathology Department of Kabul University of Medical Sciences and City Medical Laboratory. **International Journal of Cancer Management**, [s. l.], v. 14, n. 7, 2021.

SEHAQUI, Houssine; ZHOU, Qi; BERGLUND, Lars A. High-porosity aerogels of high specific surface area prepared from nanofibrillated cellulose (NFC). **Composites Science and Technology**, [s. l.], v. 71, n. 13, p. 1593–1599, 2011.

SINGH, Mandeep; PAHAL, Vikas; AHUJA, Dheeraj. Isolation and characterization of microfibrillated cellulose and nanofibrillated cellulose with “biomechanical hotspots”. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 234, p. 115827, 2020.

SMIRNOVA, Irina; GURIKOV, Pavel. Aerogel production: Current status, research directions, and future opportunities. **The Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 134, p. 228–233, 2018.

SOLEIMANI DORCHEH, A.; ABBASI, M.H. Silica aerogel; synthesis, properties and characterization. **Journal of Materials Processing Technology**, [s. l.], v. 199, n. 1–3, p. 10–26, 2008.

STERGAR, Janja; MAVER, Uroš. Review of aerogel-based materials in biomedical applications. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, [s. l.], v. 77, n. 3, p. 738–752, 2016.

TORGBO, Selorm; SUKYAI, Prakti. Biodegradation and thermal stability of bacterial cellulose as biomaterial: The relevance in biomedical applications. **Polymer Degradation and Stability**, [s. l.], v. 179, p. 109232, 2020.

VERMA, A.; SINGH, A. **Animal Biotechnology**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier, 2014.

WAGNER, William R. *et al.* **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. [S. l.]: Academic Press, 2004.

WANG, Yuchun; FERRARI, Mauro. <title>Vapor phase deposition of uniform and ultrathin silanes</title>. *In:* , 1998. (Paul L. Gourley, Org.)**Anais [...]**. [S. l.: s. n.], 1998. p. 20–28.

WU, Tingting *et al.* Dual-porous cellulose nanofibril aerogels *via* modular drying and cross-linking. **Nanoscale**, [s. l.], v. 12, n. 13, p. 7383–7394, 2020.

XIAO, Shaoliang *et al.* Fabrication and characterization of nanofibrillated cellulose and its aerogels from natural pine needles. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 119, p. 202–209, 2015.

YANG, Liangliang *et al.* High-Throughput Methods in the Discovery and Study of Biomaterials and Materiobiology. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 121, n. 8, p. 4561–4677, 2021.

ZANINI, Márcia. **Aerogéis hidrofóbicos de nanofibras de celulose** . 2016. - Universidade de Caxias do Sul – UCS, Caxias do sul, 2016.

ZHANG, Xingdong; WILLIAMS, David. **Definitions of biomaterials for the Twenty-First Century**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier, 2019.

ZIMMERMANN, Matheus Vinícius Gregory; ZATTERA, Ademir José. Silica aerogel reinforced with cellulose nanofibers. **Journal of Porous Materials**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 1325–1333, 2021.