



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

NAIARA CIPRIANO OLIVEIRA

**APLICAÇÕES DE TÉCNICAS DE IMAGEAMENTO NO ESTUDO DE
(NANO)COMPÓSITOS NATURAIS E SINTÉTICOS**

FORTALEZA

2020

NAIARA CIPRIANO OLIVEIRA

APLICAÇÕES DE TÉCNICAS DE IMAGEAMENTO NO ESTUDO DE
(NANO)COMPÓSITOS NATURAIS E SINTÉTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Física. Área de concentração: Física da Matéria Condensada.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula.
Coorientador: Dr. Rodney Marcelo do Nascimento.

Fortaleza

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- O48a Oliveira, Naiara Cipriano.
Aplicações de técnicas de imageamento no estudo de (nano)compósitos naturais e sintéticos / Naiara
Cipriano Oliveira. – 2020.
116 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em
Física, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula.
Coorientação: Prof. Dr. Rodney Marcelo do Nascimento.
1. Técnicas de Imageamento. 2. Terra Mulata de Índio. 3. Borracha Natural do Látex. I. Título.
CDD 530
-

NAIARA CIPRIANO OLIVEIRA

APLICAÇÕES DE TÉCNICAS DE IMAGEAMENTO NO ESTUDO DE
(NANO)COMPÓSITOS NATURAIS E SINTÉTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Física. Área de concentração: Física da Matéria Condensada.

Aprovada em: 15 / 12 / 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Rodney Marcelo do Nascimento (Coorientador)
Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Rafael Melo Freire
Universidade do Chile (UCHILE)

Prof. Dr. Antônio Gomes de Souza Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Odair Pastor Ferreira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Alexandre Rocha Paschoal
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

As minhas três mães, Diomar, Francisca Maria
e Luiza.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida que me foi concedida e por me amar mesmo diante de todas as minhas falhas, até quando eu mesma desisti de mim.

A minha família que sempre esteve ao meu lado, independente das escolhas ou rotas que busquei traçar, ao amor imensurável doado. Em especial a Dona Diomar (minha mãe), a Francisca Maria (minha tia-mãe), ao Ryan (meu sobrinho-filho), a Luzia Mara (minha prima-irmã), ao João Pedro (meu primo-irmão), ao Davi Lucas (meu primo-sobrinho), a Fânia (minha irmã) e ao José Filho (meu irmão *in memoriam*). Meus dias se tornam bem mais alegres quando os compartilho com vocês. Muito obrigada por existirem!

Ao Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula, pela orientação e ensinamentos durante esses seis anos de orientação, por sua disponibilidade e pelas oportunidades criadas.

Ao Dr. Rodney Marcelo do Nascimento, pela coorientação e auxílio disponibilizado, principalmente no estudo da borracha natural do látex.

Ao Prof. Dr. Antônio Gomes de Souza Filho, pela disponibilidade, apoio, incentivo, pelas oportunidades criadas e principalmente, pela amizade. Por ter me estendido à mão e me puxado pelo braço nos momentos em que mais precisei de ajuda, acho que nunca conseguirei ser suficientemente grata por isso. Obrigada por ser esse ser humano incrível!

Ao Prof. Dr. Odair Pastor Ferreira, pela disponibilidade, apoio, incentivo, ajuda e principalmente, pela amizade. Pelas longas conversas científicas e não científicas regadas a muitas gargalhadas e boa comida. E a lágrimas também, porque ninguém é de ferro!

Aos professores do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, que de uma forma ou de outra contribuíram para o meu aprendizado no decorrer desta importante etapa da minha vida.

A todos os integrantes que dividiram comigo a Sala 14 durante os seis anos que estive por lá, Adailton Filho, Francisco Emmanoel, Márcio Melo, Kevin Mota, Mapse Barroso, Nicolas e Jefferson. Em especial, a minha grande amiga Rivânia Teixeira pela amizade construída, pelo amparo nos momentos em que eu mais precisei, pelos conselhos e por dividir comigo as alegrias e angústias da vida. Riva, você é um dos presentes que eu ganhei na pós-graduação!

Aos amigos e colegas que eu cultivei durante esses anos de UFC, muito obrigada pela cumplicidade, apoio, reflexões, amizade e por fazerem parte da minha vida fora da Universidade também. Em particular, ao Thiago Moura e Fellipe Campelo.

A todos os meus amigos, em especial a minha velha amiga Fabrícia Almeida, pela cumplicidade, amizade, compreensão, carinho e por ser exemplo de determinação.

A família Cruz pelo incentivo ofertado no início dessa etapa e pelo apoio na conclusão da mesma.

A família Araújo pelo acolhimento e amor ofertado a mim durante o nosso período de convivência, em especial a Dona Marli, tia Sandra e Nimara Araújo. Muito obrigada por trazer leveza aos meus dias difíceis!

A minha psicóloga, tia Elane, pelo apoio na ressignificação dos meus valores e comportamentos, por me auxiliar no meu próprio resgate e por lutar comigo lado a lado contra a depressão e a ansiedade generalizada que me acometeram. Tia Elane, muito obrigada por me ensinar a extrair o melhor de mim!

Aos integrantes do meu grupo de pesquisa SolBIn, pela amizade e cooperatividade, em especial a Yasmine Aquino e Cecília Alves pela imensa colaboração nos estudos sobre a borracha natural do látex, a Marcella Torres por toda a ajuda com as sínteses de nanopartículas de sílica nas longas horas de bancada. A todos vocês, meu muito obrigado!

Aos integrantes do LaMFA, pela amizade e cooperatividade, em especial a Laís Helena por todo auxílio disponibilizado no laboratório.

A todos os integrantes da Central Analítica da UFC pelo auxílio.

Aos professores participantes da banca examinadora: prof. Dr. Alexandre Rocha Paschoal, prof. Dr. Antônio Gomes de Souza Filho, prof. Dr. Odair Pastor Ferreira e prof. Dr. Rafael Melo de Freire, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

As políticas públicas que foram de fundamental importância em toda minha formação, da graduação ao doutoramento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Imagens são a matéria-prima da ciência e importante modo por meio do qual a ciência tem se definido (e sido definida ou percebida por outros) por centenas de anos” (TUCKER, 2006, p. 114).

RESUMO

Na presente tese estão descritos três trabalhos envolvendo aplicações de técnicas avançadas de imageamento, por microscopia ótica e eletrônica, no estudo das amostras brasileiras Terra Mulata de Índio (TMI) e borracha natural do látex, bem como a análise dos dados obtidos através do processamento de imagens. O primeiro trabalho apresentado aqui, intitulado como “Análise morfológica de partículas de solos em múltiplas escalas de comprimento revela estoque de nutrientes de antropossolos amazônicos”, investigou *ex situ* (sem nenhum processamento químico prévio das amostras) as partículas que constituem três diferentes tipos de solos brasileiros (oxissolo, ultissolo e antropossolo amazônico “TMI”) em múltiplas escalas de comprimento por meio da microscopia eletrônica de varredura de campo amplo. Nesse estudo, as distribuições de tamanho das partículas encontradas nos solos foram calculadas com uma precisão inigualável devido às análises computacionais realizadas. Para a amostra de antropossolo, foram encontradas partículas de carbono, cuja estrutura química foi desvendada pela microespectroscopia Raman confocal. Dessa forma, por meio da abordagem analítica empregada, foi possível apresentar uma “impressão digital” da morfologia e estrutura das partículas que compõem a TMI, um solo de fertilidade sustentável elevada. No segundo trabalho, intitulado como “Uma alternativa para a produção de filmes híbridos de borracha natural-fosfato de cálcio para aplicações como revestimentos bioativos”, analisou-se a estabilidade morfológica, estrutural e físico-química de revestimentos de borracha natural incorporados com micropartículas de fosfato de cálcio bioativas, mediante a aplicação de técnicas de imageamento. Avaliou-se também a capacidade de encapsulamento do polímero natural em estudo, além da sua estabilidade como revestimento em um meio biologicamente relevante para futuras aplicações biorrelacionadas. Por fim, o terceiro estudo apresentado intitulado como: “Estudo *in situ* da estabilidade morfológica de filmes de borracha natural utilizando nanopartículas de sílica fluorescentes como sondas”, descreve que é possível avaliar *in situ*, com o emprego de técnicas de imageamento, as características morfológicas e estruturais de filmes compósitos de borracha natural incorporados com nanopartículas de sílica *core-shell* fluorescentes sem que haja qualquer modificação na amostra. Além disso, nesse trabalho investigou-se também a estabilidade dos filmes sob condições de fluxo em um meio líquido de alta resistência iônica (NaCl 0,85%), monitorada pela microscopia confocal de varredura a laser. Sendo assim, a tese em pauta contribui de maneira significativa na construção do conhecimento científico e tecnológico no que se refere a aplicações de técnicas avançadas de imageamento na investigação de amostras biológicas relevantes ao cenário mundial, podendo as abordagens apresentadas aqui ser estendidas a outras áreas do conhecimento.

Palavras-chave: técnicas de imageamento; Terra Mulata de Índio; borracha natural do látex.

ABSTRACT

In the present thesis, it is described three scientific articles on the application of advanced imaging techniques, by optical and electron microscopy, used for the study of Brazilian samples Terra Mulata de Índio (TMI) and natural rubber latex; as well as the analysis of the data obtained through image processing. The first work presented here, entitled “Morphological analysis of soil particles at multiple length-scale reveals nutrient stocks of Amazonian Anthrosols”, investigated *ex-situ* (without any previous chemical processing of the samples) particles in three different types of Brazilian soils (oxisol, ultisol, and Amazonian anthrosol “TMI”) at multiple length-scale using large-field scanning electron microscopy. In this study, the particle size distributions of the particles found in soil samples were calculated with unmatched precision due to computational analyses. In anthrosols were found carbon particles whose chemical structure was unveiled by confocal Raman microspectroscopy. Besides, through the analytical approach used, it was also possible to present a “fingerprint” of the morphology and structure of the particles of TMI, soil with high and sustained fertility. The second scientific article, entitled “Towards the production of natural rubber-calcium phosphate hybrid for applications as bioactive coatings”, describes the analysis of the morphological, structural, and physicochemical stability of natural rubber coatings incorporated with bioactive calcium phosphate microparticles through the application of imaging techniques. The encapsulation capacity of the natural polymer was also evaluated, as well as its stability as a coating in a biologically relevant medium for future bio-related applications. Finally, the third study, entitled “In situ study of the mechanical-chemical stability of natural rubber films using fluorescent silica nanoparticles as probes”, reported how it is possible to evaluate *in situ* by using imaging techniques the morphological and structural characteristics of natural rubber composite films incorporated with fluorescent silica core-shell nanoparticles, without any modification in the samples. Besides, this study also investigated the stability of films under flow conditions in a medium of high ionic strength (NaCl 0.85%) monitored by laser scanning confocal microscopy. In this sense, the thesis in question contributes significantly to the construction of the scientific and technological knowledge regarding the application of imaging techniques in the investigation of relevant biological samples to the world scenario, and the approaches presented here can be extended to other areas of the knowledge.

Keywords: imaging techniques; Terra Mulata de Índio; natural rubber latex.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Locais de coleta dos solos brasileiros: ultissolo (São Jose do Rio Preto - SP), oxissolo (Maringá-PR) e Terra Mulata de Índio (TMI) da Amazônia (Itacoatiara - AM). Os solos de TMI foram coletados em diferentes áreas da floresta, a primeira amostra em área de floresta nativa (TMI-1) e a segunda em área aberta apenas com vegetação rasteira (TMI-2) 27
- Figura 2 – Imagem de raios X de campo amplo do carbono (mapa elementar) adquirida em uma área varrida de 8 x 8 mm para a amostra de ultissolo compactada 30
- Figura 3 – Imagens de raios X de campo amplo binarizadas (mapas elementares do Al, C, Ca, Fe, P, Cr, F, Mg, Mn, Na, O, S, Si e Ti) das amostras dos solos brasileiros, ultissolo, oxissolo, TMI-1 e TMI-2, representadas em função dos elementos químicos que as compõem. As escalas X-Y do gráfico são fornecidas em milímetros (mm). Estes mapas indicam a presença (em preto) de partículas nas amostras de solo 31
- Figura 4 – Concentração de todos os elementos identificados (em contagem de intensidade) presentes nas amostras de solos brasileiros, calculadas a partir da integração das imagens de raios X de campo amplo (coluna da esquerda). Concentração dos elementos minoritários nos solos (em contagem de intensidade) representadas em uma escala Y magnificada (coluna da direita). As barras em vermelho nos gráficos representam o desvio padrão calculado a partir de pelos menos três varreduras de campo amplo realizadas para amostras independentes 34
- Figura 5 – Sobreposição da área das partículas identificadas nas imagens de raios X de campo amplo. Sobreposição da área das partículas à base de Al em relação às partículas à base de Si (esquerda) e, sobreposição de área das partículas à base de Ca em relação às partículas à base de P (direita). O valor 1 no eixo Y representa 100% de sobreposição 36
- Figura 6 – Histogramas dos componentes particulados presentes nas amostras de solos brasileiros apresentados em função dos elementos (Al, C, Ca, Fe, P, Cr, F, Mg, Mn, Na, O, S, Si e Ti) identificados a partir das imagens de raios X de

campo amplo. As áreas sombreadas de vermelho nos gráficos representam os desvios padrões, enquanto as curvas pretas representam os valores médios	37
Figura 7 – Micrografias óticas (primeira linha) das partículas de carbono micrométricas e os mapas correspondentes (segunda e terceira linhas) das bandas G e D adquiridas pela espectroscopia Raman das amostras de solo TMI-1 (a, b e c) e TMI-2 (d, e e f). (g) espectros Raman acumulativos para TMI-1 e TMI-2 (bandas G e D estão representadas) dados pelos pontos indicados	40
Figura 8 – Sobreposição de área das partículas identificadas nas imagens de raios X de campo amplo: sobreposição das partículas à base de O em relação às partículas à base de C. O valor 1 no eixo Y representa 100% de sobreposição	41
Figura 9 – EDS de um fragmento cerâmico encontrado nas amostras de TMI	42
Figura 10 – Processos de coleta e separação do látex: vista lateral da coleta do látex da árvore <i>Hevea brasiliensis</i> , vista frontal da coleta do látex em um frasco apropriado, apresentação visual do látex depois do processo de centrifugação mostrando a (a) fração creme, (b) fração soro e (c) lutóides em diferentes concentrações de amônia e forças centrífugas	56
Figura 11 – (a) Resultado do espalhamento dinâmico de luz das amostras de BN com diferentes concentrações de amônia. Comparação dos espectros de (b) FTIR-ATR e (c) Raman do cis-1,4-poliisopreno das amostras de BN com diferentes concentrações de amônia obtidas a partir de diferentes velocidades de centrifugação. Cada espectro mostrado nos painéis (b) e (c) representa a média entre três espectros diferentes para cada amostra	60
Figura 12 – Caracterização dos híbridos de BN-CaP: (a) espectros Raman obtidos com $\lambda = 514$ nm de excitação, em temperatura ambiente, antes (preto) e depois (verde) da incorporação do CaP, (b) mapeamento espectral Raman obtido a partir dos perfis de profundidade XY com planos em $Z = 0$ (topo do aglomerado) e $Z = - 2,6 \mu\text{m}$. Os perfis de intensidade foram adquiridos	

<p>tomando os picos em 1665 cm^{-1} e 2990 cm^{-1} com uma lente objetiva de 20x. A escala de cor nos painéis varia de baixa (B) a alta (A) intensidade</p>	64
<p>Figura 13 – (a) Imagens de MEV e (b) espectros Raman dos revestimentos de BN antes e depois da exposição ao SBF em diferentes tempos. (c) Análises em forma de linha dos espectros Raman e, (d - f) intensidades (I) normalizadas das regiões na faixa de $900\text{-}1060\text{ cm}^{-1}$ dos revestimentos de BN</p>	65
<p>Figura 14 – Estudos de espalhamento: decomposições dos espectros Raman das bandas na região de $900\text{-}1060\text{ cm}^{-1}$ dos revestimentos de BN antes e depois de serem expostos ao SBF em diferentes períodos de exposição</p>	66
<p>Figura 15 – Mapas químicos de EDS coloridos dos revestimentos de Si/BN-CaP antes e depois da exposição ao SBF. Imagens de MEV dos revestimentos de Si/BN-CaP com um CaP encapsulado obtido (a) antes da exposição, (b) 1 dia e (c) 30 dias após a exposição</p>	67
<p>Figura 16 – Análises de biodegradabilidade: valores de massa dos revestimentos de BN antes e depois de serem expostos ao SBF em diferentes períodos</p>	68
<p>Figura 17 – Micrografias de MEV, mapas químicos coloridos e composição química semi-quantitativa do (a) SBFSi, (b) SBFSi/BN e (c) SBFSi/BN-CaP secos após os experimentos de 30 dias em imersão</p>	69
<p>Figura 18 – Média e desvio padrão da densidade ótica das culturas de células-tronco cultivadas na superfície do híbrido de BN e do controle da cultura celular cultivada na ausência de BN para o período de uma semana. Os resultados expressos possuem em média \pm SEM, n = 12, testes de Mann & Whitney</p>	71
<p>Figura 19 – Ilustração esquemática dos principais componentes do sistema BN utilizado neste estudo. A partícula de BN, arquitetura core-shell, consiste de um núcleo formado a partir de moléculas de poliisopreno rodeado por uma fina camada composta por componentes não borracha como casa; a estrutura química da BN é formada por uma cadeia de borracha conectada a dois grupos funcionais (proteínas e fosfolipídios); e a produção das suspensões de BN-SiPs (as escalas de tamanho não equivalem ao tamanho real)</p>	82

- Figura 20 – (a) Distribuição de tamanho e índices de polidispersividade (PDI, do inglês polydispersity index) das partículas de sílica sintetizadas (SiP1 and SiP2) e amino-funcionalizadas (ASiP1 and ASiP2) obtidos através do espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês dynamic light scattering). (b) Imagens de TEM das SiPs mostrando sua forma esférica e arquitetura core-shell 86
- Figura 21 – (i) vista superior e 3D e (ii) secção transversal horizontal para $y = 50$ m das imagens de microscopia confocal de varredura a laser dos filmes compósitos de BN-SiPs produzidos a partir de BN (solubilizada em clorofórmio e tolueno) e partículas de SiPs (concentração de 0,1 mg/mL). Em (a) CLF01-SiP1, (b) CLF01-ASiP1, (c) CLF01-SiP2, (d) CLF01-ASiP2, (e) TOL01-SiP1, (f) TOL01-ASiP1, (g) TOL01-SiP2 e (h) CLF01-ASiP2. O mapeamento foi realizado utilizando diferentes comprimentos de onda, a autofluorescência da BN e os núcleos fluorescentes das SiPs foram excitados usando laser de 405 e 488 nm, respectivamente. O canal da BN está representado pela cor cinza e o canal das SiPs pela cor vermelha 88
- Figura 22 – (i) vista superior e 3D e (ii) secção transversal horizontal para $y = 50$ m das imagens de microscopia confocal de varredura a laser dos filmes compósitos de BN-SiPs produzidos a partir de BN (solubilizada em clorofórmio e tolueno) e partículas de SiPs (concentração de 0,1 mg/mL). Em (a) CLF01-SiP1, (b) CLF01-ASiP1, (c) CLF01-SiP2, (d) CLF01-ASiP2, (e) TOL01-SiP1, (f) TOL01-ASiP1, (g) TOL01-SiP2 e (h) CLF01-ASiP2. O mapeamento foi realizado utilizando diferentes comprimentos de onda, a autofluorescência da BN e os núcleos fluorescentes das SiPs foram excitados usando laser de 405 e 488 nm, respectivamente. O canal da BN está representado pela cor cinza e o canal das SiPs pela cor vermelha 90
- Figura 23 – Medidas de ângulo de contato e de energia livre de superfície e seus componentes para os filmes compósitos de BN-SiPs 92
- Figura 24 – (a) espectros Raman adquiridos utilizando uma excitação de $\lambda=532$ nm (temperatura ambiente) para a fase creme de borracha natural seca e para os filmes compósitos de BN-SiPs produzidos a partir de clorofórmio e tolueno (concentração final das SiPs de 0,1 mg/mL). (b) mapeamento espectral Raman da superfície dos filmes compósitos de BN-SiPs tomado em uma

escala de tamanho micrométrica. Os perfis de intensidade foram adquiridos com as bandas centralizadas em 2915, 1665 e 1000 cm^{-1} , correspondendo às regiões espectrais atribuídas aos seguintes modos de vibração: estiramento C-C e Si-OH, estiramento C=C e estiramento C-H. Nos painéis, a cor vermelha representa alta intensidade (A) e a cor roxa baixa intensidade (B)

94

Figura 25 – (a) espectros Raman adquiridos utilizando uma excitação de $\lambda=532$ nm (temperatura ambiente) para a fase creme de borracha natural seca e para os filmes compósitos de BN-SiPs produzidos a partir de clorofórmio e tolueno (concentração final das SiPs de 0,05 mg/mL). (b) mapeamento espectral Raman da superfície dos filmes compósitos de BN-SiPs tomado em uma escala de tamanho micrométrica. Os perfis de intensidade foram adquiridos com as bandas centralizadas em 2915, 1665 e 1000 cm^{-1} , correspondendo às regiões espectrais atribuídas aos seguintes modos de vibração: estiramento C-C e Si-OH, estiramento C=C e estiramento C-H. Nos painéis, a cor vermelha representa alta intensidade (A) e a cor roxa baixa intensidade (B)

99

Figura 26 – Resultados da análise de estabilidade morfológica dos filmes compósitos de BN-SiPs produzidos a partir do clorofórmio e tolueno com uma concentração final de SiPs de 0,05 mg/mL pelo imageamento de fluorescência das SiPs por microscopia confocal fluorescente. (a) e (d) relata a porcentagem de área ocupada, (b) e (e) número de partícula, e (c) e (f) distância média entre partículas vizinhas das SiPs fluorescentes. As áreas sombreadas em azul e vermelho indicam o desvio padrão (STD, do inglês standard deviation)

102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações relativas dos elementos químicos medidos por EAA	30
Tabela 2 – Distribuição de área dos elementos nas amostras de solo	33
Tabela 3 – Concentrações relativas dos elementos químicos medidos por EDS	35
Tabela 4 – Análise dimensional das partículas nas amostras de solo	39
Tabela 5 – Atribuições das bandas observadas nos espectros de ATR-FTIR medidas para os componentes não-isopreno do <i>cis</i> -1,4-poliisopreno das amostras de BN com diferentes concentrações de amônia obtidas a partir das diferentes velocidades de centrifugação utilizadas	61
Tabela 6 – Posições e atribuições das bandas do <i>cis</i> -1,4-poliisopreno observadas nos espectros Raman das amostras de BN com diferentes concentrações de amônia obtidas a partir de diferentes velocidades de centrifugação utilizadas	62
Tabela 7 – Descrição das amostras estudadas neste trabalho. Elas foram classificadas conforme os parâmetros utilizados na produção dos filmes compósitos de BN-SiPs (tipo de solvente utilizado nas suspensões de BN, concentração, tamanho e potencial zeta das SiPs)	81
Tabela 8 – Posições e atribuições das bandas de <i>cis</i> -1,4-poliisopreno observadas nos espectros Raman dos filmes compósitos de BN-SiPs	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APTMS	<i>(3-aminopropil) triethoxysilane</i> ((3-aminopropil)trimetoxissilano)
ATR-FTIR	<i>Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared</i> (Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier Modo de Reflexão Total Atenuada)
BN	Borracha Natural
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> (Microscopia Confocal de Varredura a Laser)
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento Dinâmico de Luz)
DTP	Distribuição de Tamanho de Partículas
EDS	<i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i> (Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X)
EAA	Espectrometria de Absorção Atômica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos)
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (Isotiocianato de Fluoresceína)
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared</i> (Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier)
GAD	<i>Gaseous Analytical Detector</i> (Detector Analítico Gasoso)
LBN	Látex de Borracha Natural
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NR	<i>Natural Rubber</i>
SBF	<i>Simulated Body Fluid</i> (Fluido Corporal Simulado)
TEOS	Tetraethyl Orthosilicate (Ortossilicato de Tetraetila)
TMI	Terra Mulata de Índio
TPI	Terra Preta de Índio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	20
2	ANÁLISE MORFOLÓGICA DE PARTÍCULAS DE SOLOS EM MÚLTIPLAS ESCALAS DE COMPRIMENTO REVELA ESTOQUE DE NUTRIENTES DE ANTROPOSSOLOS AMAZÔNICOS	23
2.1	Introdução	23
2.2	Materiais e Métodos	26
2.2.1	<i>A coleta e preparação das amostras de solos</i>	<i>26</i>
2.2.2	<i>Imageamento de raios X de campo amplo de solos brasileiros</i>	<i>27</i>
2.2.3	<i>Espectroscopia Raman</i>	<i>28</i>
2.2.4	<i>Detecção dos metais</i>	<i>29</i>
2.3	Resultados	29
2.3.1	<i>Detecção e distribuição de área das partículas pelo imageamento de raios X de campo amplo</i>	<i>29</i>
2.3.2	<i>Concentração relativa dos elementos que constituem os solos a partir da varredura de campo amplo</i>	<i>34</i>
2.3.3	<i>Funções de distribuição de tamanho das partículas de solos (DTP)</i>	<i>36</i>
2.3.4	<i>Espectroscopia Raman das partículas de carbono nos antropossolos amazônicos</i>	<i>39</i>
2.4	Discussão	41
2.5	Conclusão	45
	Referências	46
3	UMA ALTERNATIVA PARA A PRODUÇÃO DE FILMES HÍBRIDOS DE BORRACHA NATURAL-FOSFATO DE CÁLCIO PARA APLICAÇÕES COMO REVESTIMENTOS BIOATIVOS	53
3.1	Introdução	53
3.2	Procedimentos Experimentais	55
3.2.1	<i>Separação do creme de borracha natural</i>	<i>55</i>
3.2.2	<i>Produção dos revestimentos híbridos de BN-CaP</i>	<i>57</i>
3.2.3	<i>Incubação em fluido corporal simulado</i>	<i>57</i>
3.2.4	<i>Caracterizações física e química</i>	<i>58</i>
3.3	Resultados e discussão	59

3.3.1	<i>Avaliação morfológica e estrutural das partículas de BN</i>	59
3.3.2	<i>Caracterização dos híbridos BN-CaP e suas propriedades de encapsulamento</i>	63
3.3.3	<i>Características superficiais dos revestimentos de BN e BN-CaP em SBF</i>	64
3.3.4	<i>Biodegradabilidade dos revestimentos de BN em fluido corporal simulado</i> ...	68
3.3.5	<i>Viabilidade celular das superfícies de BN-CaP</i>	70
3.4	Conclusão	72
	Referências	72
4	ESTUDO <i>IN SITU</i> DA ESTABILIDADE MORFOLÓGICA DE FILMES DE BORRACHA NATURAL UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA FLUORESCENTES COMO SONDAS	76
4.1	Introdução	76
4.2	Materiais e Métodos	78
4.2.1	<i>Materiais</i>	78
4.2.2	<i>Síntese das SiPs fluorescentes core-shell</i>	79
4.2.3	<i>Funcionalização superficial das SiPs fluorescentes core-shell</i>	79
4.2.4	<i>Preparação das suspensões de BN</i>	80
4.2.5	<i>Produção dos filmes compósitos de BN-SiPs</i>	80
4.2.6	<i>Caracterização das partículas de sílica fluorescentes</i>	82
4.2.7	<i>Caracterização microscópica e espectroscópica dos filmes compósitos de BN-SiPs</i>	83
4.2.8	<i>Caracterização da molhabilidade de superfície dos filmes compósitos de BN-SiPs</i>	83
4.2.9	<i>Estabilidade morfológica dos filmes compósitos de BN-SiPs sob condições de fluxo</i>	84
4.2.10	<i>Algoritmo para análise da distribuição e estabilidade das partículas de SiPs nos filmes compósitos de BN-SiPS</i>	85
4.3	Resultados e Discussão	86
4.3.1	<i>Caracterização das partículas de sílica fluorescentes</i>	86
4.3.2	<i>Aspectos morfológicos e estruturais dos filmes compósitos de BN-SiPs</i>	87
4.3.3	<i>Estabilidade morfológica dos filmes compósitos de BN-SiPs</i>	101
4.4	Conclusões	104
	Referências	105

5	CONCLUSÕES GERAIS	111
	REFERÊNCIAS	113
	APÊNDICE A – PROCESSAMENTO DE IMAGENS	114

1 INTRODUÇÃO GERAL

“Imagens são a matéria-prima da ciência e importante modo por meio do qual a ciência tem se definido (e sido definida ou percebida por outros) por centenas de anos”, com esta citação concisa de Jennifer Tucker (2006, p. 114) inicia-se a apresentação desta tese de doutorado. Desde 721 a.C. há relatos na história da ciência de um cristal de rocha, conhecido como lentes de Lanyard, que foi talhado, polido e tinha propriedades de ampliação (WILLIAM, 2006). O emprego de técnicas de imageamento, como por exemplo, a microscopia ótica mudou por completo a forma na qual o homem passou a ver o mundo, permitindo-o observar e explorar os mais variados contextos até então inexplorados, o que disseminou em uma revolução no conhecimento científico.

As diversas técnicas de imagem utilizadas nos mais variados contextos científicos e tecnológicos estão categorizadas na literatura de acordo com a sua fonte de energia, exemplificando, tem-se a microscopia ótica que utiliza fótons da luz visível ($\lambda = 300 - 700$ nm) como fonte de iluminação, enquanto a microscopia eletrônica utiliza elétrons-livres ($\lambda \approx 1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$). Uma variedade de informações tais como tamanho, forma, estrutura, composição e cristalinidade, podem ser desvendadas por meio do emprego de técnicas de imageamento (PETRY et al., 2019). Além disso, a análise das imagens resultantes representa uma das principais etapas da construção do conhecimento científico e tecnológico. A tecnologia digital moderna, por sua vez, fornece ferramentas imprescindíveis à análise de tais dados. O processamento de imagem pode ser compreendido como a manipulação de imagens digitais, seja com a finalidade de valorização das informações visuais existentes facilitando assim a interpretação humana, ou com a finalidade de extrair informações pelo processamento de dados que compõem uma imagem, sendo este processo automatizado por algoritmos computacionais (GONZALEZ; WOODS, 2010).

O processamento de imagens vem apresentando um crescimento significativo com o aprimoramento da tecnologia moderna, abrangendo diversas áreas relacionadas com a atividade humana, as imagens de satélite, por exemplo, fornecem informações sobre condições climáticas e culturas agrícolas. A medicina por sua vez, promove o diagnóstico e tratamento de doenças por meio do imageamento biomédico e, a indústria inspeciona o controle de qualidade de seus produtos analisando imagens de placas de circuito através de sistemas de visão computacional. Além disso, esse método também é muito utilizado em sistemas de segurança, como em tecnologias de reconhecimento facial, identificação de impressões digitais, dentre outras aplicações (JOSHI, 2018).

Nesse contexto, são fundamentais e de suma importância o emprego de técnicas de imageamento que corroborem com a investigação/entendimento de problemas científicos e suas variáveis, bem como a análise desses dados através do processamento de imagens. A investigação em múltiplas escalas de comprimento das características morfológicas e estruturais de materiais biológicos, como os que serão estudados aqui, por meio de técnicas avançadas de imageamento e processamento de imagens é uma das propostas de estudo do SolBIn (Solid-Biological Interface Group), um grupo de pesquisa inserido no Departamento de Física da UFC idealizado e coordenado pelo professor Dr. Amauri Jardim de Paula. O SolBIn busca estudar os múltiplos aspectos e fenômenos manifestados na interface entre superfícies sólidas e componentes biológicos, através de uma abordagem multidisciplinar. Além da proposta já citada, outras questões de grande relevância para a comunidade científica também são exploradas, tais como: (i) entender como células e bactérias se aderem e crescem em superfícies sólidas, (ii) obter coloides estáveis e revestimentos superficiais de nanopartículas inorgânicas com bioefeitos potencializados, (iii) estudo das interações ocorrentes quando nanopartículas encontram fluidos biológicos, (iv) estudo da organização e atividade de nanopartículas em sistemas biológicos em largas escalas de comprimento.

Esta tese exemplificará a proposta mencionada acima, por meio do estudo de três trabalhos produzidos pelo presente grupo de pesquisa. Dois deles publicados em periódicos internacionais e um ainda em processo de publicação, também em periódico internacional. O primeiro artigo científico, que será estudado aqui no capítulo 2, foi publicado no ano de 2018 na *Geoderma* (volume 311, pág. 58-66), uma revista global de ciências do solo com um fator de impacto de 4,848 (2019). Intitulado aqui como “Análise morfológica de partículas de solos em múltiplas escalas de comprimento revela estoque de nutrientes de antropossolos amazônicos” (título original *Morphological analysis of soil particles at multiple length-scale reveals nutrient stocks of Amazonian Anthrosols*), neste artigo partículas dos solos brasileiros oxissolo, ultissolo e antropossolo amazônico, foram imageadas em múltiplas escalas de comprimento e, suas distribuições de tamanho calculadas através de análises computacionais com uma precisão inigualável. Os solos foram imageados *ex situ*, sem qualquer processamento químico prévio, por meio da microscopia eletrônica de varredura de campo amplo. Além disso, desvendou-se também a estrutura química de partículas de carbono encontradas nas amostras de antropossolo amazônico pela microespectroscopia Raman confocal (OLIVEIRA et al., 2018).

O capítulo 3 abordará o segundo artigo científico publicado no ano de 2019 na *Materials Science and Engineering C* (volume 94, pág. 417-425), uma revista sobre materiais

para aplicações biológicas que inclui tópicos na interface das ciências biomédicas e engenharia de materiais, com um fator de impacto de 5,88 (2019). Aqui intitulado como “Uma alternativa para a produção de filmes híbridos de borracha natural-fosfato de cálcio para aplicações como revestimentos bioativos” (título original *Towards the production of natural rubber-calcium phosphate hybrid for applications as bioactive coatings*), este trabalho consiste no estudo da estabilidade morfológica, estrutural e físico-química de revestimentos de borracha natural incorporados com micropartículas bioativas de fosfato de cálcio. As técnicas de imageamento empregadas avaliaram a capacidade de encapsulamento do polímero natural utilizado, assim como a sua estabilidade como revestimento em um meio biologicamente relevante para futuras aplicações biorrelacionadas (DO NASCIMENTO et al., 2019a).

O capítulo 4 se referirá ao terceiro artigo científico ainda em processo de publicação, que possui como título “Estudo *in situ* da estabilidade morfológica de filmes de borracha natural utilizando nanopartículas de sílica fluorescentes como sondas” (título original *In situ study of the morphological stability of natural rubber films using fluorescent silica nanoparticles as probe*). Neste trabalho descreve-se como é possível avaliar *in situ* características morfológicas e estruturais de filmes compósitos de borracha natural incorporados com nanopartículas de sílica *core-shell* fluorescentes sem que haja qualquer modificação da amostra. Além disso, as sílicas foram utilizadas como sondas na investigação da estabilidade dos filmes sob condições de fluxo em um meio líquido de alta resistência iônica (NaCl 0,85%), monitorada pela microscopia confocal de varredura a laser. E por fim, o capítulo 5, constituído pelas conclusões gerais desta tese, descreve os principais potenciais de aplicações das técnicas avançadas de imageamento utilizadas aqui nos variados contextos, assim como as perspectivas geradas a partir dos estudos apresentados.

2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE PARTÍCULAS DE SOLOS EM MÚLTIPLAS ESCALAS DE COMPRIMENTO REVELA ESTOQUE DE NUTRIENTES DE ANTROPOSOLOS AMAZÔNICOS

2.1 Introdução

A estrutura de solos é composta por uma organização hierárquica de materiais orgânicos e inorgânicos em níveis que variam do subnanômetro à escala macroscópica (GIMÉNEZ et al., 1997; JASTROW, 1996). A matéria inorgânica, ou seja, os minerais estão presentes no estado ionizado e/ou organizados em aglomerados e partículas (nano à macroescala) (HUGHES; MOORE; GLASS, 2015; KAHLE; KLEBER; JAHN, 2002). Por outro lado, a matéria orgânica inclui todas as moléculas à base de carbono, conjuntos moleculares e partículas, incluindo resíduos vegetais e animais, e a biomassa de microrganismos vivos e outras faunas (LAL, 2007; RINNAN; RINNAN, 2007). Dada a definição dos conceitos acima, a fertilidade de um solo pode ser definida como um ajuste fino entre os aspectos composicionais e estruturais. Considerada uma propriedade complexa e emergente (CHAPARRO et al., 2012), ela representa um fator crucial no que diz respeito à produção agrícola e a segurança alimentar. Especificamente, a fertilidade está relacionada com a capacidade do solo em fornecer para as plantas o necessário ao seu crescimento e desenvolvimento, incluindo fatores como produtividade, reprodução e qualidade das culturas agrícolas resultantes (ABBOTT L.K., 2007; ATKINSON; FITZGERALD; HIPPS, 2010).

Uma determinação moderna e completa da fertilidade de solos envolve a avaliação de seus aspectos biológicos, químicos e físicos, bem como as consequentes interações/relações múltiplas e complexas entre os três. Na literatura, existem protocolos bem estabelecidos para a caracterização físico-química de solos. Como por exemplo, a identificação e quantificação de íons e moléculas por meio de protocolos de Química Analítica, como a extração e o fracionamento (HUO; YUSHENG; KINGSTON, 1998; QIAN et al., 1996; WANG et al., 2017; XINDE; XIAORONG; GUIWEN, 2000), além de métodos cromatográficos e espectroscópicos (HERNANDEZ-SORIANO et al., 2016; JÁUREGUI; MOYANO; GALCERAN, 1998; MALLEY et al., 1999; PASCAUD et al., 2017; UDELHOVEN; EMMERLING; JARMER, 2003). Contudo, ambas as frações de partículas (inorgânicas e orgânicas) presentes em solos são difíceis de serem identificadas, classificadas e caracterizadas, especialmente *ex situ*, sem que haja uma preparação/processamento prévio das amostras a serem analisadas.

Métodos granulométricos também são amplamente empregados no estudo de solos, envolvendo o peneiramento gradual, devido sua relativa simplicidade. Tais métodos são capazes de fornecer algumas informações sobre o tamanho das partículas que o compõem (DE SOUZA et al., 2016; LI et al., 2016; VAN REEUWIJK, 2002; VILLAVERDE et al., 2009; YIN et al., 2016), contudo eles não possibilitam uma medição precisa das funções de distribuição de tamanho das partículas (DTP). Sendo esta considerada um fator de fundamental importância em modelos matemáticos de processos de fluxo e transporte que ocorrem em solos; permitindo assim, a determinação da retenção de água, bem como outras propriedades hidráulicas (ARYA; PARIS, 1981; GUPTA; LARSON, 1979; MOHAMMADI; VANCLOOSTER, 2011).

Alternativamente, técnicas de dispersão de luz podem ser utilizadas para a determinação da DTP, para partículas dispersas num meio líquido, como por exemplo, o espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *dynamic light scattering*). No entanto, esta técnica apresenta uma precisão limitada para amostras polidispersas como amostras de solo, uma vez que ela resulta apenas na caracterização de partículas pequenas, numa faixa de tamanho micrométrica ou abaixo desta (KRETZSCHMAR; HOLTHOFF; STICHER, 1998; NGUYEN et al., 2013, 2017). Além do mais, para a obtenção de dispersões de partículas de solo em um meio líquido se faz necessário a utilização de ácidos fortes, agentes oxidantes e/ou sais (KRETZSCHMAR; HOLTHOFF; STICHER, 1998; NGOLE-JEME; EKOSSE, 2015; NGUYEN et al., 2013, 2017; VAN REEUWIJK, 2002).

Por outro lado, métodos modernos de microscopia eletrônica são capazes de revelar, com grandes detalhes, a morfologia de partículas de solos, assim como a sua composição elementar através da espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS, do inglês *energy dispersive X-ray spectroscopy*) conjugada ao microscópio. Todavia, tanto a microscopia eletrônica de varredura (MEV) quanto à microscopia eletrônica de transmissão (MET) apresentam certa limitação devido à baixa amostragem de partículas imageadas para análises realizadas em altas magnificações (ARCHANJO et al., 2014; GILKES, 2015; YANG et al., 2016). Sendo assim, com a finalidade de solucionar tal problemática, novas abordagens microscópicas devem ser empregadas possibilitando o imageamento de partículas com uma elevada amostragem e em múltiplas escalas de comprimento, além de determinar sua composição e revelar sua morfologia numa escala de comprimento que varie do micrômetro ao centímetro.

Recentemente, conforme mostrado pelo presente grupo de pesquisa, isso pode ser alcançado através do imageamento de raios X de campo amplo em combinação com

algoritmos de análises de imagens (NORONHA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2015; SOUSA et al., 2016). De forma que, a aplicação desta abordagem em amostras de solo pode desvendar direto ou indiretamente aspectos da sua fertilidade, principalmente aqueles relacionados à sustentabilidade, ou seja, ao armazenamento de elementos químicos como o carbono, fósforo, nitrogênio e cálcio, presentes em solos como partículas (KERN; KAMPF, 1989). Nesse contexto, com relação à biologia, física e química que influenciam a fertilidade de solos, o imageamento de campo amplo pode desvendar com elevada precisão diversos aspectos das duas últimas, por exemplo.

Considerando as perspectivas apresentadas acima para o imageamento mencionado, utilizou-se aqui esta abordagem de microscopia na tentativa de avaliar as notáveis capacidades da fertilidade do solo amazônico “Terra Mulata de Índio” mediante o imageamento *ex-situ* das partículas que o compõem. É conhecido que solos antropogênicos (ou antropossolos) apresentam uma fertilidade sustentada em determinadas regiões e são caracterizados por uma alta concentração de matéria orgânica estabilizada, fósforo e cálcio. Além de conter artefatos arqueológicos, como fragmentos de cerâmica, o que reforça ainda mais a sua origem humana (HASTIK; GEITNER; NEUBURGER, 2013; TAUBE et al., 2013). Entretanto, na literatura ainda não há informações precisas sobre a distribuição de tamanho das partículas que compõem antropossolos amazônicos. Além disso, aqui também foram investigadas suas características composicionais e morfológicas, as amostras de TMI foram comparadas com amostras de oxissolo e ultissolo coletadas em diferentes regiões do Brasil.

Para cada uma das amostras compactadas (discos de 10 mm de diâmetro) realizou-se uma varredura sequencial das áreas subjacentes (sem processamento químico) de toda área da amostra. As análises computacionais das imagens de campo amplo revelaram com maiores detalhes a composição química, morfologia e distribuição de tamanho das partículas dos solos estudados, em múltiplas escalas de comprimento (micrômetros a milímetros). Além do mais, uma análise comparativo-quantitativa de todos os elementos químicos detectados nas amostras, como por exemplo, cálcio, potássio e magnésio, também pode ser realizada com uma elevada precisão devido ao tipo de varredura utilizada. Dessa forma, pode-se obter a “impressão digital” dos nutrientes e de outros elementos/compostos presentes em um solo de alta fertilidade sustentada, como a Terra Mulata de Índio. Ademais, empregou-se também a espectroscopia Raman, com o intuito de complementar com informações estruturais as análises descritas acima. Logo, o conhecimento fornecido por este trabalho é de fundamental importância na determinação de características morfológicas e

estruturais adequadas para possíveis processos de modificação do solo, tais como a aplicação de biocarvão, que pode melhorar a fertilidade, bem como um futuro sequestro de carbono no solo (ARCHANJO et al., 2014; ATKINSON; FITZGERALD; HIPPS, 2010; HERNANDEZ-SORIANO et al., 2016; MEYER; GLASER; QUICKER, 2011; YANG et al., 2016).

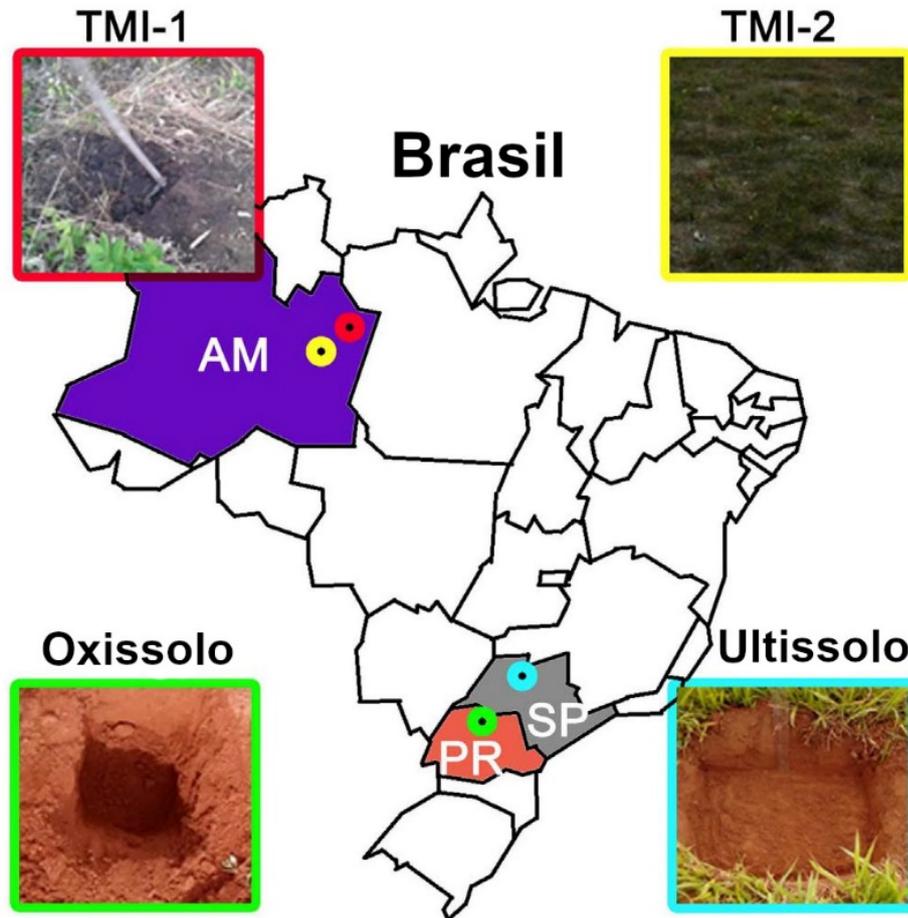
2.2 Materiais e métodos

2.2.1 A coleta e preparação das amostras de solos

As amostras de solo analisadas aqui foram coletadas em três locais distintos do Brasil. A amostra de oxissolo foi coletada em Maringá - PR (Latitude: 23°23'16,63" Sul, Longitude: 51°59'29,37" Oeste), a de ultissolo em São José do Rio Preto - SP (Latitude: 20°48'19,79" Sul, Longitude: 49°19'43,51" Oeste) e a Terra Mulata de Índio na floresta amazônica em Itacoatiara - AM, ver Figura 1. Vale ressaltar, que as amostras de solo amazônico foram coletadas em diferentes áreas da floresta (autorização do SISBio pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Ministério do Meio Ambiente, nº 50042-2), a primeira em área de floresta nativa (denominada TMI-1; Latitude: 3°04'05,17" Sul, Longitude: 58°34'11,68" Oeste) e a segunda amostra coletada em área aberta apenas com vegetação rasteira (denominada TMI-2; Latitude: 3° 04'05,45" Sul e 58° 33'51,11" Oeste).

Para cada solo, as amostras foram coletadas a uma profundidade de 0,00-0,30 m da superfície. E após a coleta, foram secas a temperatura ambiente e, em seguida, peneiradas em uma peneira de tamanho 10 com abertura de malha de 2 mm, a fim de remover apenas os resíduos maiores, plantas, pedras e fragmentos cerâmicos. Depois, compactou-se em triplicata 0,5 g de cada amostra em discos de 10 mm de diâmetro. E por fim, os discos de solos foram introduzidos na câmara do microscópio eletrônico de varredura sem qualquer tipo de preparação química prévia. É importante mencionar, que as nomenclaturas oxissolo e ultissolo utilizadas aqui, foram classificadas de acordo com o *Soil Survey Staff* (Equipe de Pesquisa de Solos, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, 2014); sendo estas equivalentes a latossolo e argissolo, respectivamente, no Sistema Brasileiro de Ciência do Solo (EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2013).

Figura 1 - Locais de coleta dos solos brasileiros: ultissolo (São José do Rio Preto - SP), oxissolo (Maringá - PR) e Terra Mulata de Índio (TMI) da Amazônia (Itacoatiara - AM). Os solos de TMI foram coletados em diferentes áreas da floresta, a primeira amostra em área de floresta nativa (TMI-1) e a segunda em área aberta apenas com vegetação rasteira (TMI-2).



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al. (2018, p. 59)

2.2.2 Imageamento de raios X de campo amplo de solos brasileiros

Os sinais de raios X foram obtidos por EDS, registrados ao longo de uma varredura de campo amplo realizada em um microscópio eletrônico de varredura Quanta-450 (FEI), equipado com um canhão por emissão de campo, estágio de 100 mm de diâmetro e detector de raios X (modelo 150, Oxford). As amostras de solo compactadas (discos) foram introduzidas na câmara do microscópio sem nenhum tipo de preparação química prévia. As varreduras foram realizadas em modo de baixo vácuo, com uma pressão na câmara do microscópio de aproximadamente 100 Pa de vapor de água, para evitar o carregamento da amostra, com uma tensão de aceleração do feixe de 20 kV e uma abertura da condensadora de

50 μm . Para esse valor de tensão, a corrente do feixe de elétrons sobre a amostra foi cerca de 10 nA.

Um detector do tipo cone analítico gasoso (GAD, do inglês *gaseous analytical detector*) foi utilizado em todas as varreduras, para maximizar o caminho do feixe em alto vácuo e minimizar o efeito saia gerado na câmara do microscópio. O detector de EDS, por sua vez, é posicionado no final da peça polar, formando um ângulo de coleta de 55° com o eixo da coluna do microscópio. A distância de trabalho foi fixada em 10 mm, para todas as análises, sendo a varredura eletrônica de campo amplo realizada ao longo de uma área de 8 x 8 mm dos discos de solos, durando cerca de 10 h a análise para cada disco. Vale ressaltar, que a definição e sensibilidade das imagens obtidas através da varredura de campo amplo são amplamente aumentadas, uma vez que os dados resultantes contêm sinais acumulativos de mais de 800 imagens de raios X e espectros de EDS.

Para as varreduras realizadas nesse trabalho, as imagens individuais possuem campos horizontais e verticais de 0,411 e 0,283 mm, respectivamente, com uma definição de 512 x 352 pixels. Na varredura de campo amplo, a relação sinal-ruído também é amplamente aumentada, o que possibilita o imageamento de elementos químicos presentes em baixas concentrações nas amostras ($< 1\%$), ou seja, elementos traços. Uma descrição detalhada do processo de montagem para a geração de imagens de raios X foi fornecida pelo presente grupo de pesquisa em trabalhos anteriores (NORONHA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2015; SOUSA et al., 2016). Além disso, todas as etapas do processamento de imagens utilizadas aqui podem ser visualizadas no **Apêndice A**.

2.2.3 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman confocais foram adquiridos usando um microscópio alpha300 (WITec) equipado com um estágio piezoelétrico altamente linear e uma lente objetiva da Nikon (100x, NA = 0,90). Para a aquisição dos espectros, as amostras TMI-1 e TMI-2 foram iluminadas com um laser Nd:YAG (2,33 eV, $\lambda = 532 \text{ nm}$) e a luz Raman detectada por um dispositivo espectroscópico retroiluminado de alta sensibilidade posicionado atrás de uma grade de 600 g/mm. A potência do laser, no final da lente objetiva, utilizada para focalizar as amostras de TMI foi de 70 μW . Utilizou-se aqui um WITec UHTS 300, espectrômetro com ultra-alta taxa de transferência (até 70%), projetado especificamente para microscopia Raman. As áreas medidas para as amostras TMI-1 e TMI-2 são de 20 x 20 μm , com 60 pixels em cada direção; e com um tempo de integração de 0,2 s/pixel.

2.2.4 Detecção dos metais

A digestão das amostras de solo foi realizada de acordo com o método US EPA 3050B (USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, 1996). As concentrações de Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn foram determinadas utilizando um espectrômetro de absorção atômica com chama 240FS, Varian. O laboratório no qual essas análises foram realizadas (Laboratório de Estudos em Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Campus São José do Rio Preto) participou de exames de proficiência organizados pela Embrapa, para a determinação de metais em amostras de tecido vegetal e sempre alcançou resultados satisfatórios ($z < 2$).

2.3 Resultados

2.3.1 Detecção e distribuição de área das partículas pelo imageamento de raios X de campo amplo

Um total de 14 elementos químicos foi identificado nas imagens de raios X de campo amplo: alumínio (Al $K\alpha$), carbono (C $K\alpha$), cálcio (Ca $K\alpha$), cromo (Cr $K\alpha$), flúor (F $K\alpha$), ferro (Fe $K\alpha$), magnésio (Mg $K\alpha$), manganês (Mn $K\alpha$), sódio (Na $K\alpha$), oxigênio (O $K\alpha$), fósforo (P $K\alpha$), enxofre (S $K\alpha$), silício (Si $K\alpha$) e titânio (Ti $K\alpha$). Vale mencionar, que o cobre (Cu) não pode ser propriamente identificado a partir da técnica de EDS, devido a um efeito de empilhamento de sinais (*pile-up*), gerado pela combinação de fótons de raios X do alumínio (Al $K\alpha$) e silício (Si $K\alpha$) com fótons de raios X do ferro (Fe $K\alpha$), energia em torno de 8 keV. Sendo assim, tal efeito impediu o acúmulo correto de sinal na geração do pico Cu $K\alpha$, além de se considerar a baixa concentração desse elemento em amostras de solo. O mesmo ocorreu para o potássio (K), energia em torno de 3,3 keV, devido ao empilhamento de sinais dos fótons de raios X do alumínio (Al $K\alpha$) e silício (Si $K\alpha$). Além do sinal do zinco (Zn $K\alpha$), energia em torno de 8,6 keV, encontrar-se abaixo do limite de detecção da técnica. Neste contexto, empregou-se a espectrometria de absorção atômica (EAA) como uma alternativa para identificação e quantificação (concentração relativa) desses elementos, ver Tabela 1.

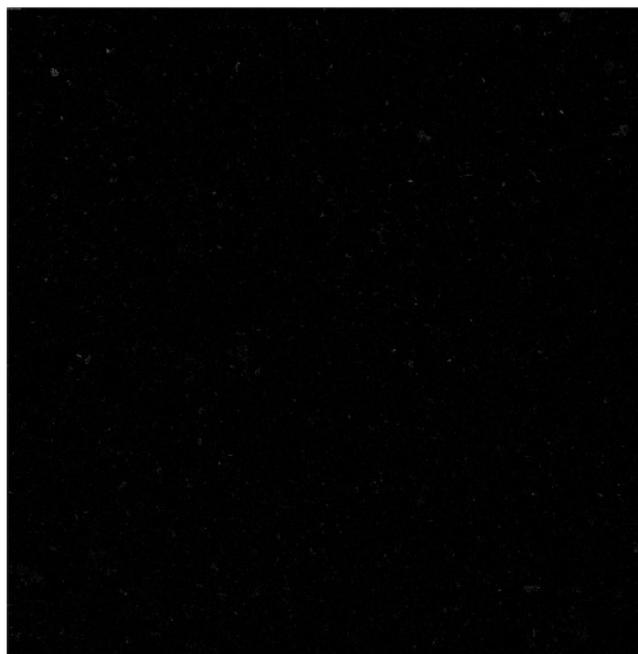
Tabela 1 - Concentrações relativas dos elementos químicos medidos por EAA.

	Ultissolo	Oxissolo	TMI-1	TMI-2
	10 ⁻³ % m/m			
Al	2.214	8.567	6.685	6.738
Ca	14,2	39,7	670,1	627,3
Cu	0,5	22,8	2,0	2,7
Fe	1.834	11.000	1.648	1.613
K	43,2	26,4	47,6	82,3
Mg	13,2	15,6	22,5	33,4
Mn	14,9	76,3	86,7	102,3
Na	16,4	34,4	26,5	38,4
Zn	0,2	0,9	1,2	0,5

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al. (2018).

A visualização de partículas nos mapas brutos de campo amplo (8 x 8 mm) é difícil de ser realizada, em especial para os elementos que possuem nanopartículas micrométricas, C, Cr, Ca, P e Ti, ver exemplo para o mapa de carbono na Figura 2. Nesse sentido, as imagens apresentadas aqui como resultado das análises de EDS possuem um tamanho reduzido, representando apenas uma área da amostra de 4,8 x 4,8 mm. As imagens de raios X de campo amplo, ou seja, os mapas elementares representando os elementos Al, C, Ca, Fe, P, Mg, Mn, Na, O, S, Si e Ti podem ser visualizados na Figura 3.

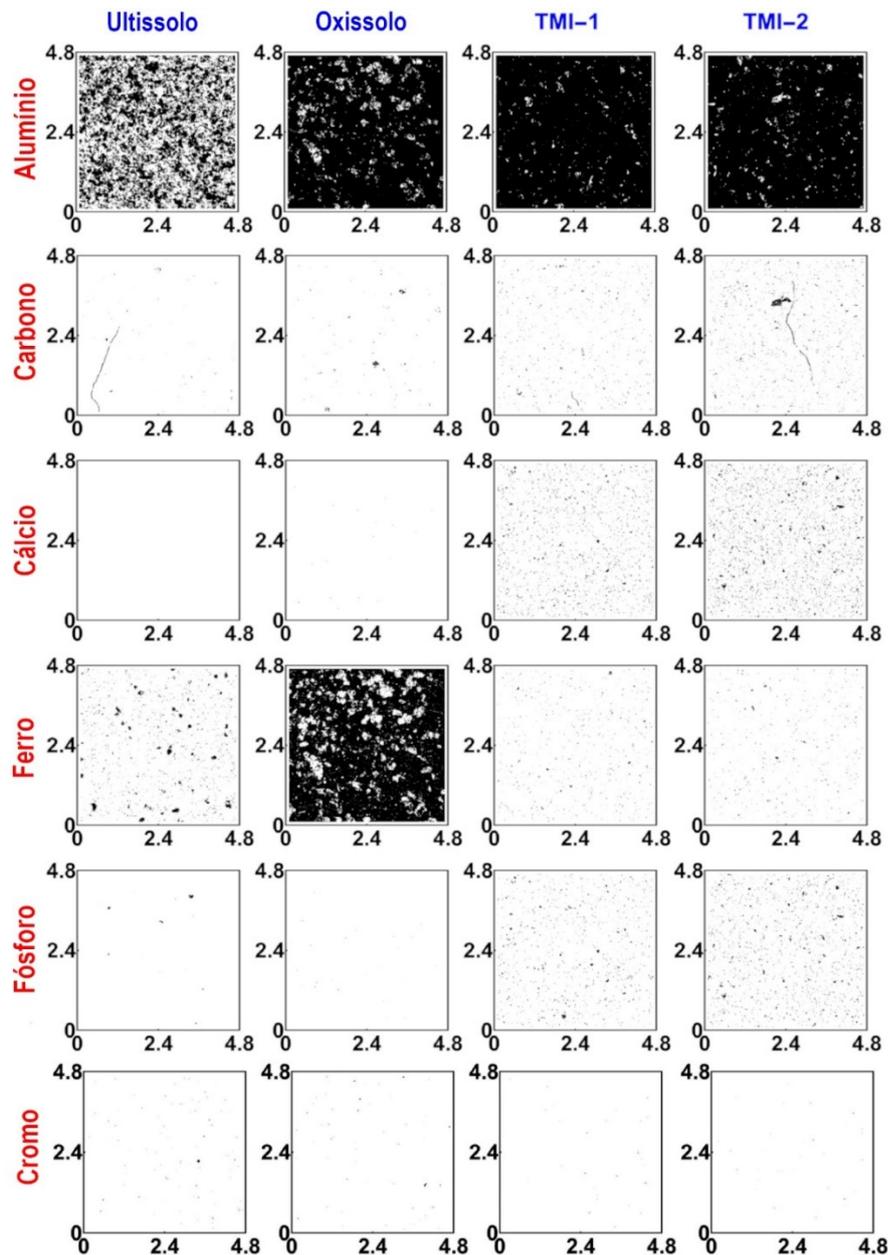
Figura 2 - Imagem de raios X de campo amplo do carbono (mapa elementar) adquirida em uma área varrida de 8 x 8 mm para a amostra de ultissolo compactada.

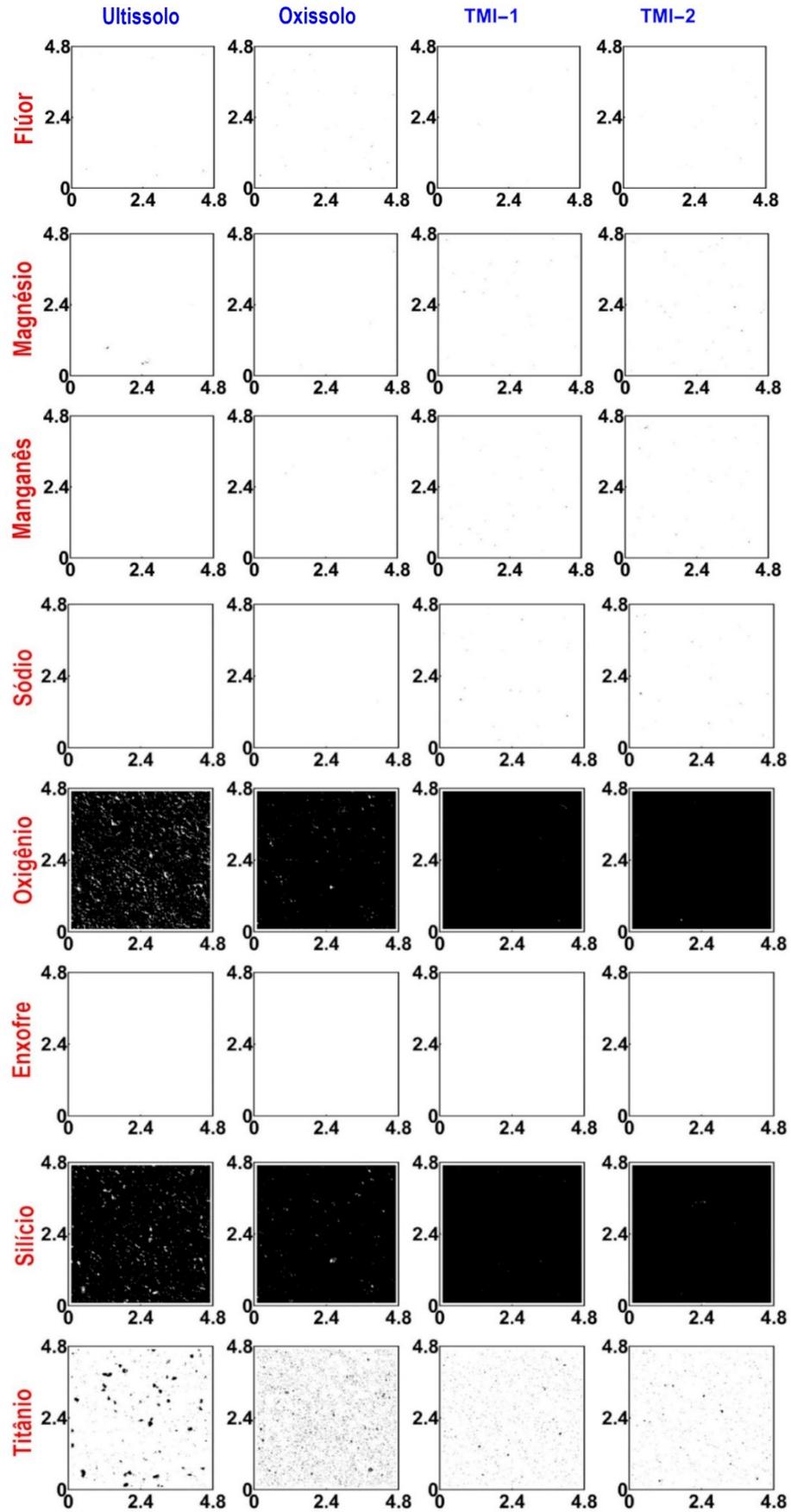


Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al. (2018).

Tomando uma escala milimétrica como referência, os solos são constituídos por partículas formadas principalmente por compostos de alumínio (Al), silício (Si) e oxigênio (O). De acordo com os mapas elementares desses elementos, ver Figura 3, pode-se observar que eles se encontram distribuídos homogeneamente em todas as amostras de solo. Além disso, os mapas elementares do Al e do Si exibem uma sobreposição significativa para todas as amostras analisadas, uma vez que ocorrem nos solos como aluminossilicatos, ver Figura 3.

Figura 3 - Imagens de raios X de campo amplo binarizadas (mapas elementares do Al, C, Ca, Fe, P, Cr, F, Mg, Mn, Na, O, S, Si e Ti) das amostras dos solos brasileiros, ultissolo, oxissolo, TMI-1 e TMI-2, representadas em função dos elementos químicos que as compõem. As escalas X-Y do gráfico são fornecidas em milímetros (mm). Estes mapas indicam a presença (em preto) de partículas nas amostras de solo.





Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al. (2018).

No entanto, para a amostra de ultissolo, a sobreposição do Al e Si é significativamente menor (~ 40% de área) do que para as outras amostras de solo (> 80% de área), indicando que a maior parte do Si no ultissolo não está presente como aluminossilicatos. Além desses elementos principais, também foi observada a presença de partículas para o C, Ca, Cr, F, Fe, Mg, Mn, Na, O, P, S e Ti; embora ocupem uma porção menor de área varrida, com exceção do Fe na amostra de oxissolo, o qual encontra-se largamente distribuído, ver Figura 3. As distribuições dos elementos Al, Si e O em porcentagem (%) de área nas imagens de campo amplo foram $\geq 90\%$, com exceção do Al para a amostra de ultissolo (37,6%), ver Tabela 2. O Fe, por sua vez, encontra-se largamente distribuído no oxissolo (58,4%). Todos os outros elementos ocuparam menos que 2% de área das imagens de campo amplo para todas as amostras, ver Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição de área dos elementos nas amostras de solo.

Elementos	Porcentagem de área total ocupada pelas partículas (% área) ^a			
	Ultissolo	Oxissolo	TMI-1	TMI-2
Al	37,6 (1,94)	89,1 (2,32)	94,1 (1,66)	90,5 (3,56)
C	0,10 (0,07)	0,08 (0,06)	0,29 (0,16)	0,44 (0,08)
Ca	b	b	0,75 (0,14)	1,33 (0,34)
Cr	0,06 (0,02)	0,03 (0,02)	b	b
F	b	b	b	b
Fe	1,47 (0,31)	58,4 (27,7)	0,27 (0,02)	0,24 (0,06)
Mg	b	b	b	b
Mn	b	b	b	b
Na	b	b	0,01 (b)	b
O	83,0 (1,98)	97,7 (0,44)	99,1 (0,49)	97,8 (1,67)
P	0,03 (1,59)	b	0,60 (0,09)	1,00 (0,26)
S	b	b	b	b
Si	93,0 (1,59)	98,0 (0,44)	99,3 (0,37)	98,4 (1,19)
Ti	1,40 (0,25)	1,36 (0,39)	0,25 (0,03)	0,20 (0,04)

^a os valores entre parênteses são o desvio padrão

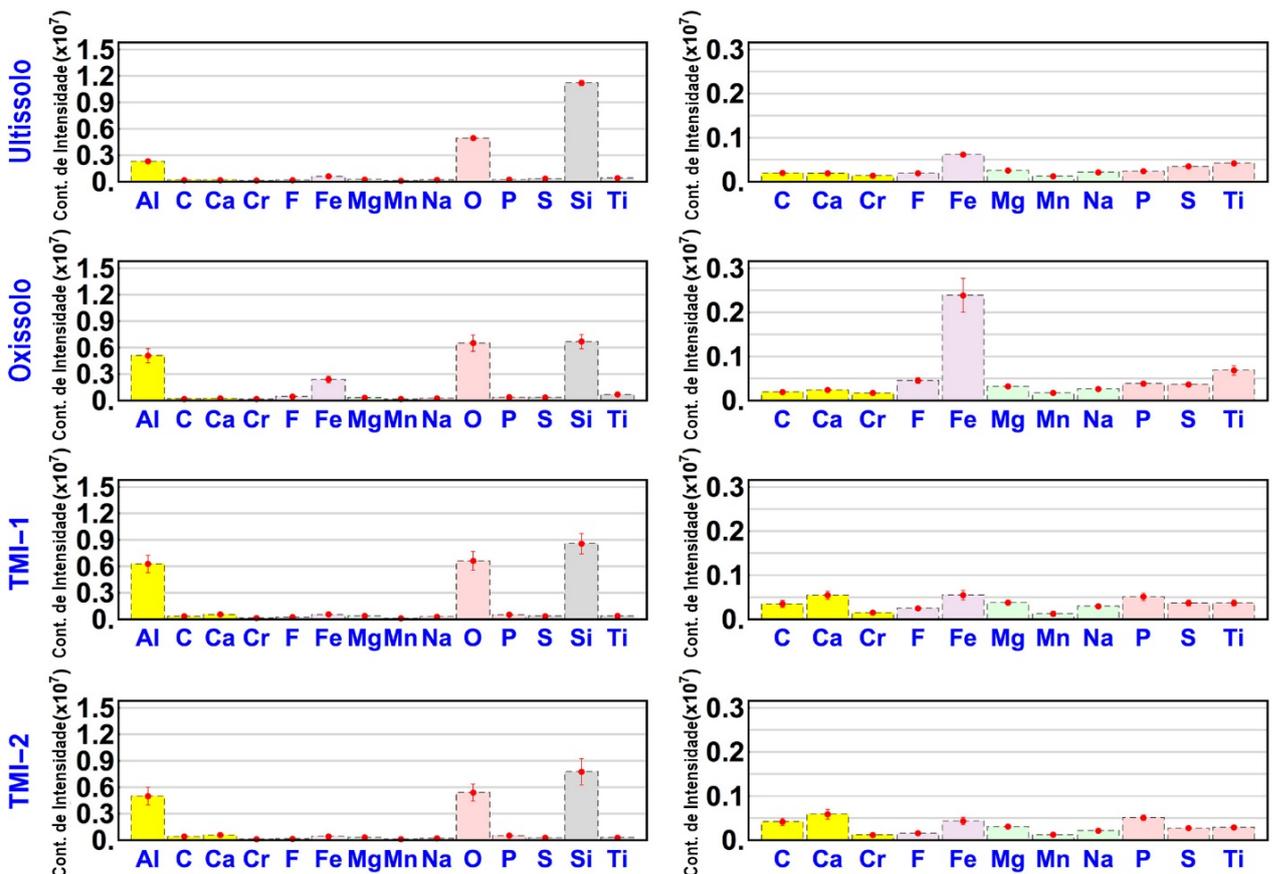
^b valores pequenos (abaixo de 0,01% de área)

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al. (2018, p. 61).

2.3.2 Concentração relativa dos elementos que constituem os solos a partir da varredura de campo amplo

As concentrações relativas dos elementos que compõem os solos foram calculadas através da integração e correlação das áreas dos picos apresentados na acumulação dos espectros de EDS, ver Figura 4. O sinal acumulativo é resultado da somatória de todos os espectros adquiridos ao longo da varredura de campo amplo para cada amostra de solo, fator que contribui diretamente para o aumento da precisão nesse tipo de análise (OLIVEIRA et al., 2015).

Figura 4 - Concentração de todos os elementos identificados (em contagem de intensidade) presentes nas amostras de solos brasileiros, calculadas a partir da integração das imagens de raios X de campo amplo (coluna da esquerda). Concentração dos elementos minoritários nos solos (em contagem de intensidade) representadas em uma escala Y magnificada (coluna da direita). As barras em vermelho nos gráficos representam o desvio padrão calculado a partir de pelos menos três varreduras de campo amplo realizadas para amostras independentes.



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al. (2018, p. 62).

Os valores das concentrações relativas em função das massas (% m/m) para os elementos cuja concentração excede 0,5% podem ser vistos na Tabela 3. Tomando os elementos majoritários, pode-se observar que as razões entre os elementos Si/Al e Si/O são substancialmente maiores no ultissolo quando comparadas as outras amostras, ver Figura 5. Este fato, juntamente com a baixa concentração de Al detectada pela espectrometria de absorção atômica, ver Tabela 1, confirmam que os aluminossilicatos são menos abundantes para este tipo de amostra.

Tabela 3 - Concentrações relativas dos elementos químicos medidos por EDS.

	Ultissolo			Oxissolo			TMI-1		TMI-2	
	MA ^a (g mol ⁻¹)	% m/m ^b	CN (mol) ^c							
C	12,00	20,9	69,5	17,4	40,8	22,6	150,2	23,9	158,8	
O	15,99	43,3	108,0	42,3	74,5	46,8	233,4	44,1	219,9	
F	18,99	1,8	3,8	2,0	3,0	1,9	8,0	1,7	7,1	
Na	22,99	d	-	d	-	d	-	d	-	
Mg	24,30	d	-	d	-	d	-	d	-	
Al	26,98	4,3	6,4	9,8	10,2	10,0	29,6	9,5	28,1	
Si	28,08	24,4	34,7	13,2	13,2	14,6	41,5	15,5	44,0	
P	30,97	d	-	d	-	0,5	0,5	0,7	1,8	
S	32,06	d	-	d	-	d	d	d	-	
Ca	40,07	d	-	d	-	0,7	0,7	1,2	2,4	
Ti	47,86	1,2	1,0	1,7	1,0	0,6	0,6	0,6	1,0	
Cr	51,99	d	-	d	-	d	d	d	-	
Mn	54,93	d	-	d	-	d	d	d	-	
Fe	55,84	3,5	2,5	13,0	6,6	2,0	2,9	2,3	3,3	

^a Massa atômica.

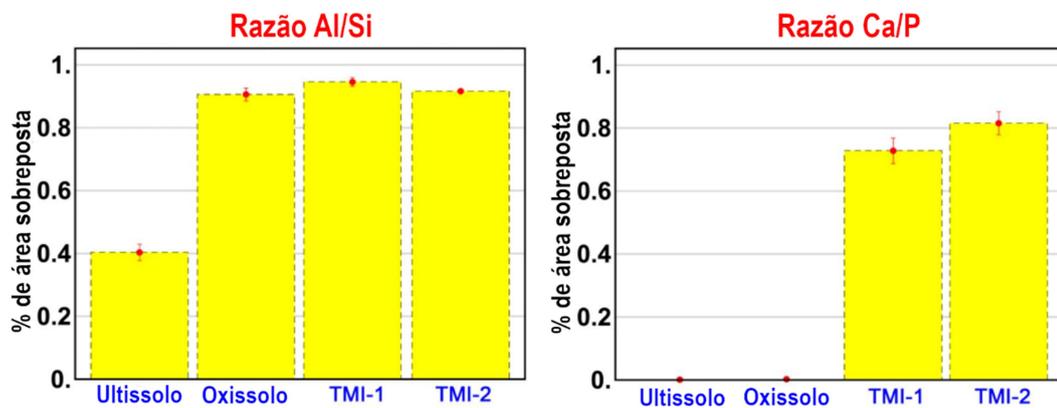
^b Os valores de % m/m são concentrações relativas obtidas através de um método independente, após a correlação de todas as intensidades dos picos de EDS.

^c As concentrações molares relativas normalizadas (CN, em unidades molares) foram calculadas pela divisão de cada valor de % m/m pela a massa atômica (g mol⁻¹) de cada elemento e, então os resultados foram normalizados em relação ao elemento presente em menor quantidade.

^d Os valores de % m/m para os elementos presentes em baixas concentrações (< 0,5% m/m) não podem ser interpretados quantitativamente devido à precisão da técnica de EDS, embora eles possam ser detectados.

Além disso, também foram encontradas diferenças importantes entre as concentrações relativas dos elementos minoritários que compõem as amostras de solo, como por exemplo, para os elementos C, Ca, Cr, F, Fe, Mg, Mn, Na, P, S e Ti, ver Figura 4. As concentrações relativas do C, Ca e P foram maiores nas amostras TMI-1 e TMI-2, enquanto que as concentrações relativas do F, Fe e Ti foram maiores no oxissolo. Uma maior concentração de Fe no oxissolo também foi confirmada pela espectrometria de absorção atômica, ver Tabela 1 (ROSCOE, 2003).

Figura 5 - Sobreposição da área das partículas identificadas nas imagens de raios X de campo amplo. Sobreposição da área das partículas à base de Al em relação às partículas à base de Si (esquerda) e, sobreposição de área das partículas à base de Ca em relação às partículas à base de P (direita). O valor 1 no eixo Y representa 100% de sobreposição.

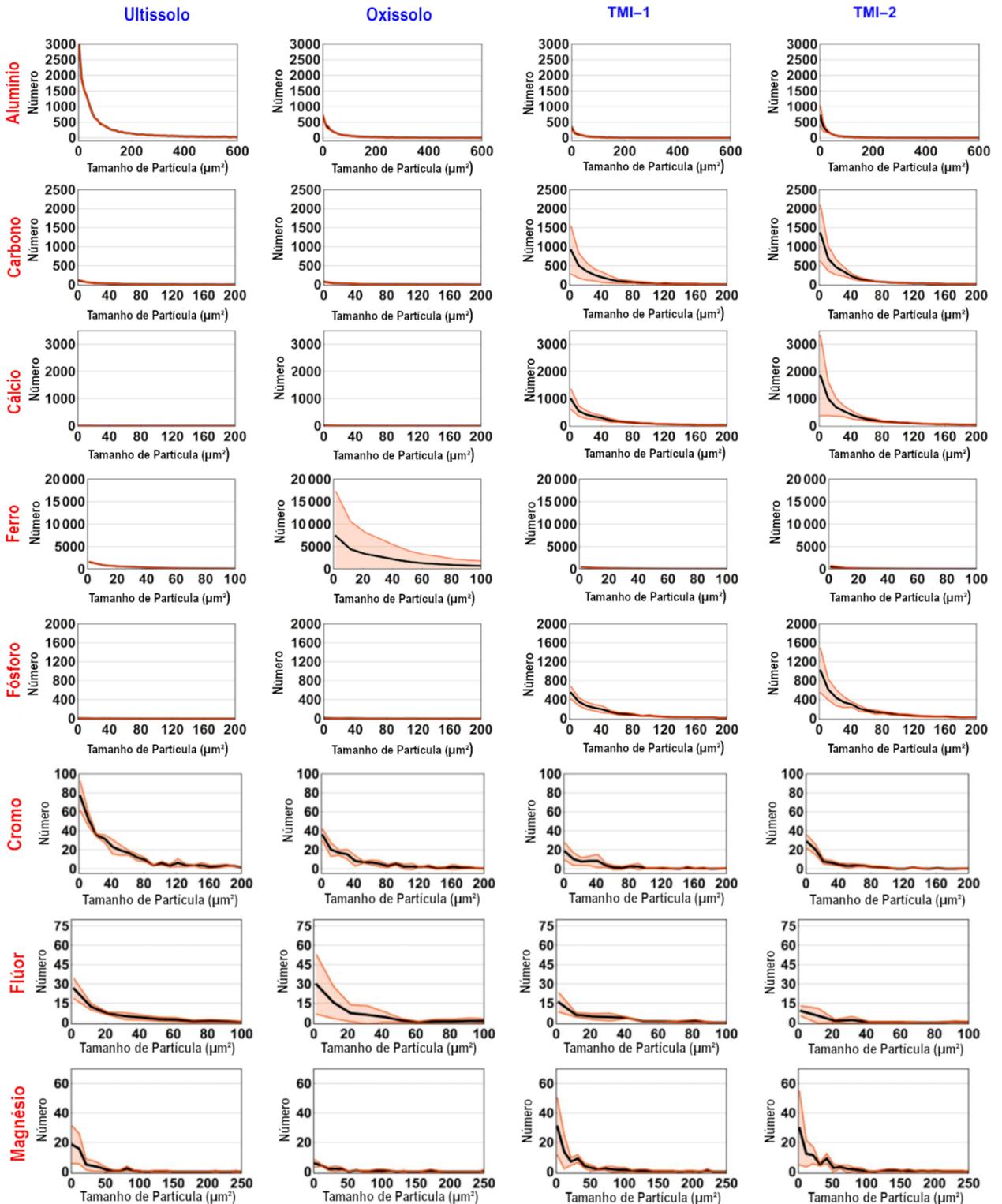


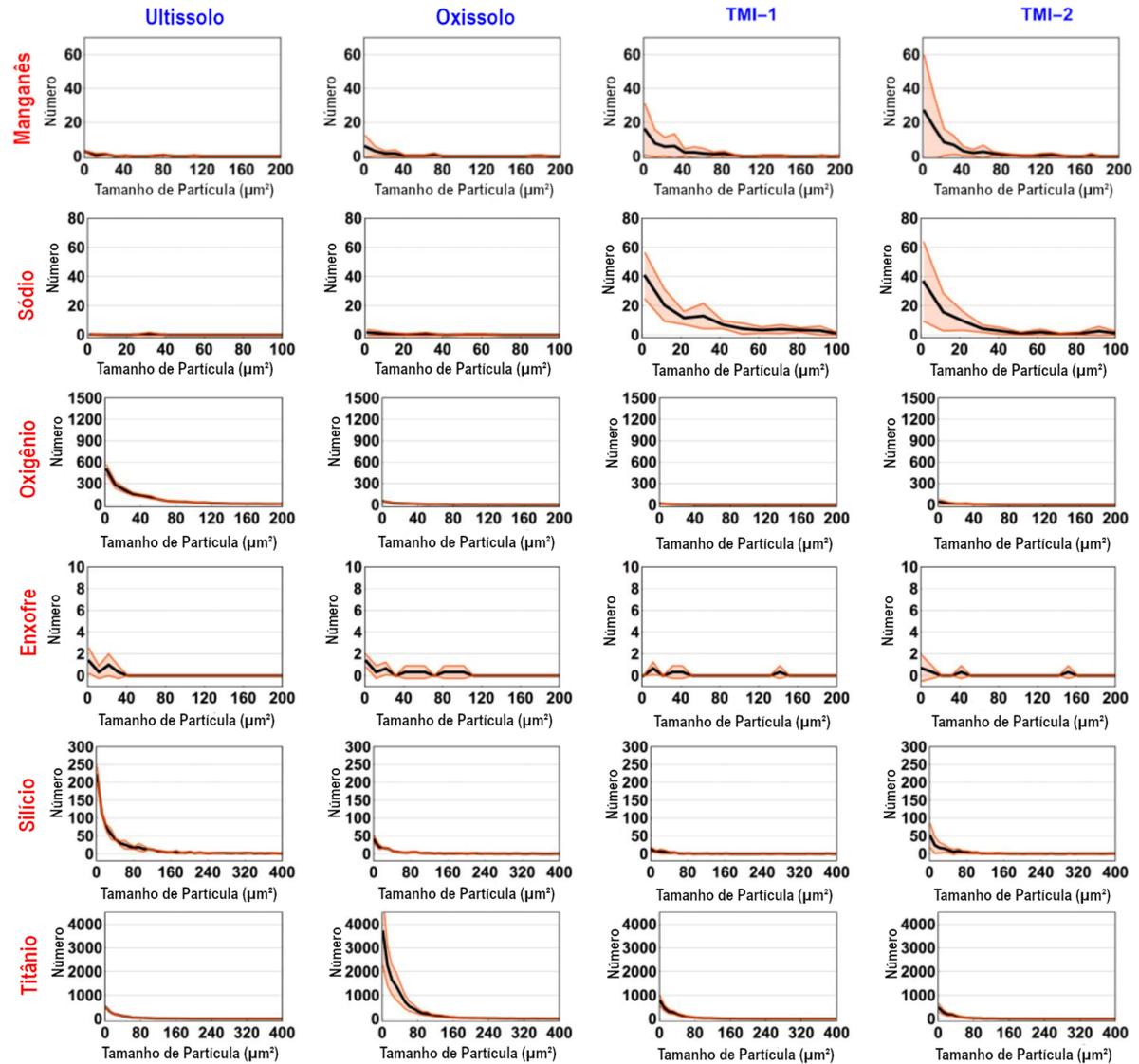
Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al. (2018).

2.3.3 Funções de distribuição de tamanho das partículas de solos (DTP)

Ao se analisar as partículas dos solos brasileiros em estudo por meio de funções de DTP, com área de secção transversal mínima de $2,5 \mu\text{m}^2$, observou-se que as partículas à base de Al (área de até $200 \mu\text{m}^2$) ocorrem em quantidades maiores no ultissolo; enquanto nas outras amostras, seus tamanhos estão abaixo de $100 \mu\text{m}^2$, ver Figura 6. O mesmo padrão ocorre para as partículas à base de Si, onde a amostra TMI-1 possui menos partículas ($< 100 \mu\text{m}^2$). Para os elementos minoritários, foi observada a presença de (i) partículas à base de Cr em todas as amostras ($< 200 \mu\text{m}^2$) e (ii) partículas à base de Ti principalmente na amostra de oxissolo ($< 200 \mu\text{m}^2$).

Figura 6 - Histogramas dos componentes particulados presentes nas amostras de solos brasileiros apresentados em função dos elementos (Al, C, Ca, Fe, P, Cr, F, Mg, Mn, Na, O, S, Si e Ti) identificados a partir das imagens de raios X de campo amplo. As áreas sombreadas de vermelho nos gráficos representam os desvios padrões, enquanto as curvas pretas representam os valores médios.





Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al. (2018).

Em todas as amostras foram identificadas partículas compostas por Cr, F, Mg, Mn, Na e S em uma quantidade significativamente reduzida. Nas amostras TMI-1 e TMI-2 identificou-se uma grande concentração de partículas à base de C, Ca e P (de até $100 \mu\text{m}^2$), ver colunas 3 e 4 na Figura 6. Além disso, juntamente com o aumento do número de partículas à base de C, Ca e P, ver Figura 6, ocorreu uma diminuição da distância média entre partículas vizinhas (partículas mais próximas) nas amostras de TMI-1 e TMI-2, para valores de cerca de $40\text{-}70 \mu\text{m}$, enquanto estes foram cerca de centenas de micrômetros para as amostras de ultissolo e oxissolo, ver Tabela 4.

Tabela 4 - Análise dimensional das partículas nas amostras de solo.

Elementos minoritários	Distância média entre partículas vizinhas mais próximas (μm^2) ^a			
	Ultissolo	Oxissolo	TMI – 1	TMI – 2
C	175 (205)	190 (194)	59,1 (50,8)	45,7 (39,0)
Ca	^b	333 (459)	57,0 (35,8)	43,1 (26,4)
Cr	186 (154)	251 (282)	338 (446)	399 (326)
F	390 (214)	363 (492)	553 (445)	255 (269)
Fe	41,0 (32,1)	16,6 (12,5)	84,6 (62,9)	85,7 (59,8)
Mg	664 (810)	898 (668)	368 (203)	454 (417)
Mn	^b	70,6 (135)	634 (315)	416 (444)
P	468 (587)	601 (417)	70,6 (44,2)	54,1 (35,3)
S	^b	^b	^b	^b
Ti	84,3 (57,4)	32,7 (17,5)	77,8 (44,7)	100 (58,8)

^a Os valores em parênteses são os desvios padrões.

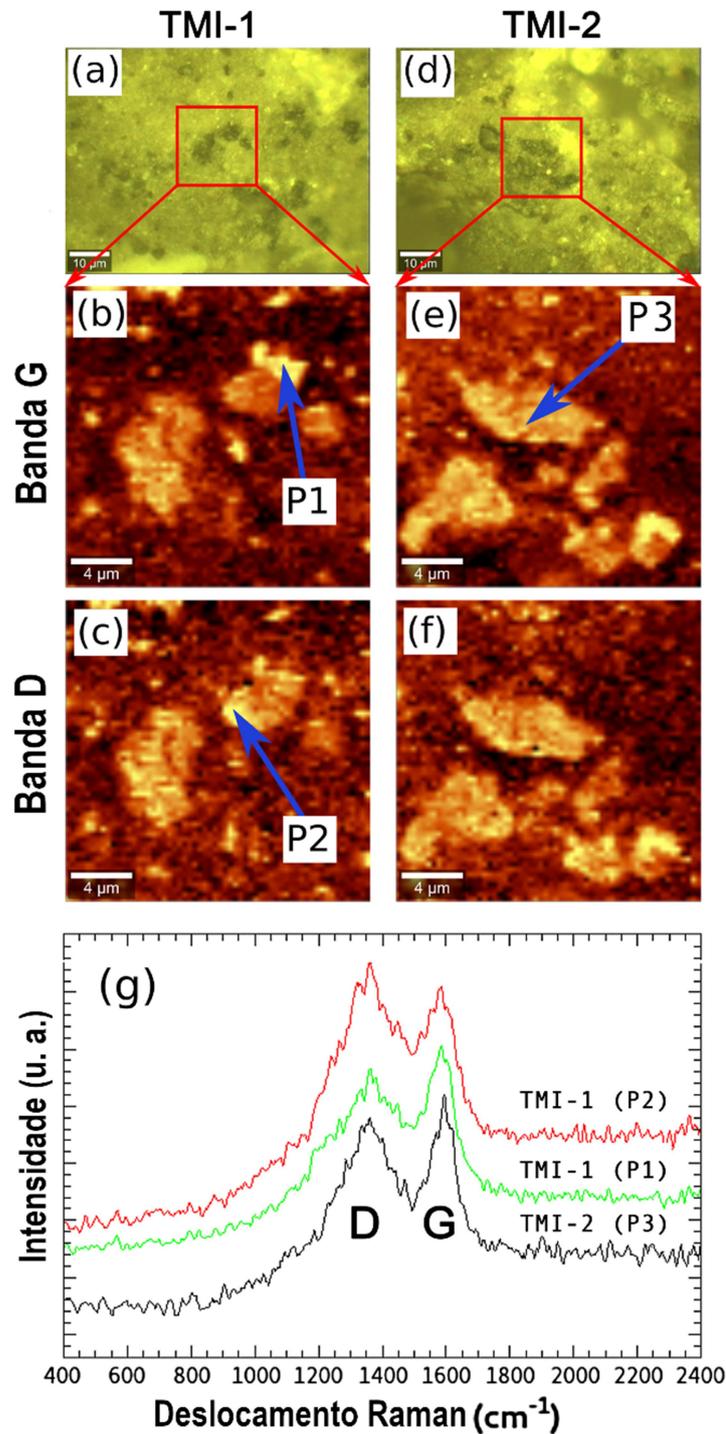
^b Uma pequena quantidade de partículas detectadas impedindo o cálculo.

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al. (2018, p. 63).

2.3.4 Espectroscopia Raman das partículas de carbono nos antropossolos amazônicos

Com a finalidade de avaliar a estrutura química das partículas de carbono, em maiores detalhes, milhares de espectros Raman em escala de comprimento micrométrica foram capturados das amostras de TMI-1 e TMI-2. As imagens espectroscópicas Raman das áreas integradas das bandas G (cerca de 1590 cm^{-1}) e D (cerca de 1360 cm^{-1}) presentes em TMI-1 e TMI-2 são mostradas na Figura 7, conforme a figura é mostrada claramente a correlação entre as áreas escuras nas imagens óticas e os mapas das bandas G e D. Os espectros adquiridos para as várias partículas de carbono em escala de comprimento micrométrica para as amostras TMI-1 e TMI-2 indicaram uma alta razão sp^2 e sp^3 , considerando tanto a frequência da banda G quanto sua largura à meia altura (RIBEIRO-SOARES et al., 2013). Além disso, confirmou-se também uma estrutura química desordenada, visto que os mapas das bandas G e D se sobrepõem em grande parte para todas as partículas imageadas. Os espectros Raman mostrados na Figura 7(g) são muito similares, exceto para a amostra TMI-1, pois nesta observou-se uma variação na intensidade relativa das bandas G e D (pontos P1 e P2, indicados pelas setas).

Figura 7 - Micrografias óticas (primeira linha) das partículas de carbono micrométricas e os mapas correspondentes (segunda e terceira linhas) das bandas G e D adquiridas pela espectroscopia Raman das amostras de solo TMI-1 (a, b e c) e TMI-2 (d, e e f). (g) espectros Raman acumulativos para TMI-1 e TMI-2 (bandas G e D estão representadas) dados pelos pontos indicados.

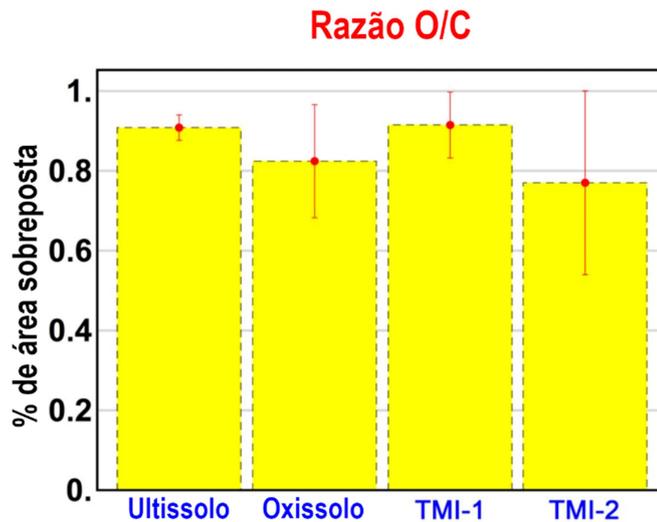


Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al. (2018, p. 64).

Nesse sentido, há uma indicação clara da heterogeneidade da desordem estrutural para as partículas de carbono desse tipo de solo. Considerando que os mapas de C e O não

possuem uma sobreposição perfeita nas imagens de raios X de campo amplo para TMI-1 e TMI-2, ver Figura 8, deve-se considerar também que a desordem identificada nessas partículas está relacionada à falta de cristalinidade causada por outros defeitos que não os introduzidos pela oxidação.

Figura 8 - Sobreposição de área das partículas identificadas nas imagens de raios X de campo amplo: sobreposição das partículas à base de O em relação às partículas à base de C. O valor 1 no eixo Y representa 100% de sobreposição.



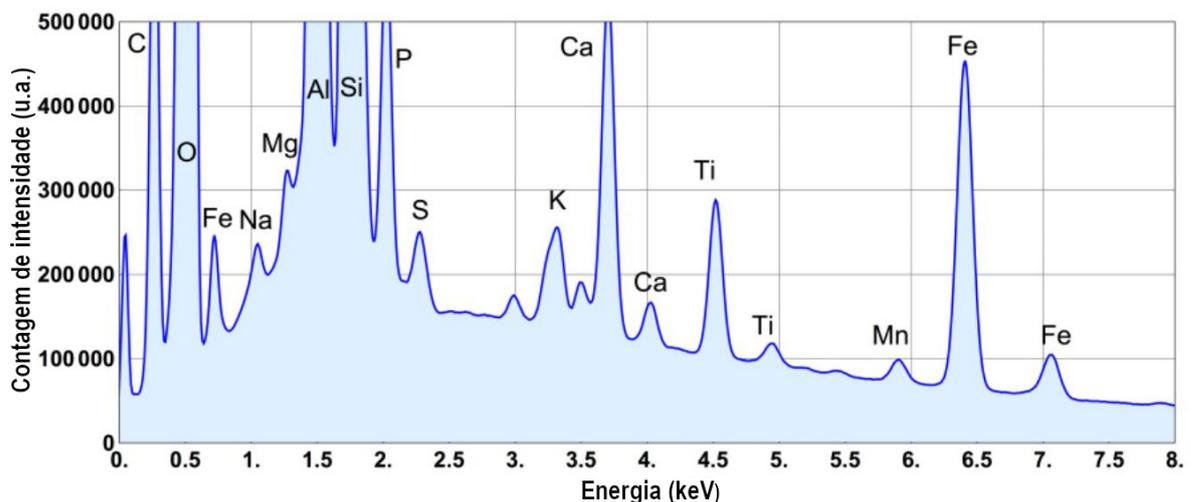
Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al. (2018).

2.4 Discussão

É evidente, devido ao imageamento de raios X de campo amplo das amostras dos solos brasileiros ultissolo, oxissolo e terra preta da Amazônia “Terra Mulata de Índio”, que ocorrem diferenças notáveis entre as partículas que os compõem. Com relação à fertilidade, deve-se considerar a presença em grandes quantidades de partículas à base de C, Ca e P encontradas em TMI-1 e TMI-2. Além disso, também foram encontrados fragmentos cerâmicos nas amostras de TMI-1 e TMI-2. Sendo importante mencionar, que as duas amostras de TMI analisadas aqui foram coletadas em locais distintos, com cerca de 3 quilômetros de distância entre si. Não pode ser ignorado, um possível papel desses fragmentos na liberação de nutrientes para os solos TMI-1 e TMI-2, considerando que os mesmos possuem a seguinte composição química, 9,5% m/m de C, 3,9% m/m de Fe, 1,5% m/m de Ca e 1,1% m/m de P, ver Figura 9.

Valente e Costa (2017) investigaram o papel de fragmentos cerâmicos na fertilidade de solos antropogênicos da Bacia Amazônica. Esses autores quantificaram a troca de K ($0,3 - 1,6 \text{ cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$), Ca ($0,2 - 27 \text{ cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$), Mg ($0,02 - 1,4 \text{ cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$), Zn ($0,05 - 13,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Mn ($3 - 56 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e a disposição de P ($1,0 - 1,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) em 44 amostras (VALENTE; COSTA, 2017). Comparativamente, os solos de TMI também contêm uma quantidade significativamente grande de C, bem como outros elementos, tais como o Ca e P (GLASER et al., 2001; LEHMANN et al., 2003; STEINER, 2007). Sendo estes, os elementos-chave que influenciam o potencial de produção e a fertilidade dos mais variados solos.

Figura 9 - EDS de um fragmento cerâmico encontrado nas amostras de TMI.



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al. (2018).

As concentrações de Ca foram no mínimo 14 vezes maiores em TMI-1 e TMI-2, em comparação com as outras amostras dos solos investigados, como calculadas pela espectrometria de absorção atômica, ver Tabela 1. De forma que, tal elemento químico está presente nesses solos principalmente como partículas, ver coluna 3 e 4 na Figura 6. Além do mais, as partículas de Ca identificadas nos mapas elementares de campo amplo em TMI-1 e TMI-2 sobrepõem-se majoritariamente com as partículas de P ($> 70\%$ de área), ver Figura 7, indicando que os dois elementos estão associados nessas amostras. Mostrou-se também que o Ca está associado com o P em partículas micrométricas de até $150 \mu\text{m}^2$, ver Figura 6. Interessantemente, essa mesma sobreposição não ocorreu para as outras amostras ($\sim 0\%$ de área), ver Figura 5. Embora tenha sido demonstrado previamente que o Ca e o C ocorrem e

estão associados em nanopartículas (de centenas de nanômetros) em terras escuras da Amazônia “Terra Preta de Índio” (TPI) (ARCHANJO et al., 2014; JORIO et al., 2012); após o processamento das imagens de raios X de campo amplo realizado neste estudo, não se detectou nenhuma sobreposição combinando os mapas desses elementos em larga escala de comprimento. O mesmo resultado também foi observado em outro estudo sobre a TPI (ARCHANJO et al., 2015).

A razão molar entre o Ca e o P calculada para as inúmeras partículas identificadas nas amostras TMI-1 e TMI-2 variou de 1,2 a 2,2. Tal razão foi calculada a partir da soma dos valores de contraste (em escala de cinza) presentes em todos os pixels que compõem as partículas nas imagens de raios X de campo amplo. Nesse sentido, deve-se considerar a presença desses elementos associados em partículas de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$). Deve-se considerar também a ocorrência do Ca adsorvido às partículas, em uma menor extensão (ARCHANJO et al., 2014). A origem das partículas de Ca-P em antropossolos, como a TMI, pode estar relacionada com uma decomposição inicial de ossos de animais e peixes, que se transformam de formas cristalinas e termodinamicamente estáveis em formas solúveis de Ca-P com o passar do tempo (SATO et al., 2009; WALKER; SYERS, 1976).

Em relação às partículas micrométricas à base de C identificadas nas amostras dos solos TMI-1 e TMI-2, estudos recentes sobre a TPI indicaram que a estrutura química de tais partículas nesse tipo de solo poderia ser classificada como se estivesse no limite entre um nanografite e um carbono amorfo, considerando a escala do processo de amorfização (RIBEIRO-SOARES et al., 2013). A banda G, por exemplo, é um dos modos vibracionais característicos em materiais grafiticos e pode revelar o grau de hibridização sp^2 (modo de estiramento tangencial), enquanto que a banda D indica o grau de desordem na estrutura grafitica (ALLEN; TUNG; KANER, 2010; JORIO et al., 2012). Sendo a última relacionada à presença de ligações flutuantes, dopagem e o mais importante, ao grau de oxidação da folha grafitica (ANDRADE et al., 2013; ARCHANJO et al., 2015; FARIA et al., 2012; PAULA et al., 2011). De forma mais específica, a oxidação resulta da formação de grupos oxigenados na estrutura das partículas de carbono, na qual inclui a presença de álcoois, cetonas, ácidos carboxílicos, fenóis e anidridos (CHEN; FENG; LI, 2012; ROS et al., 2002).

A falta de uma sobreposição perfeita entre os mapas elementares do C e O nas imagens de raios X de campo amplo dos solos TMI-1 e TMI-2 (valores médios abaixo de 90% de área), ver Figura 8, indicam que as partículas de carbono não estão totalmente oxidadas, assim apoiando as descobertas citadas anteriores que foram desenhadas em escalas de

comprimento menores (micrômetros). As regiões sobre as quais os mapas do O e C se sobrepõem resultam da presença de grupos oxigenados, tais como ácidos carboxílicos, cetonas, álcoois, éteres, ésteres e outros (ARCHANJO et al., 2014), que controla diversos processos de difusão no solo por meio de eventos de sorção que ocorrem a partir das interações com esses grupos oxigenados (ATKINSON; FITZGERALD; HIPPS, 2010; HERNANDEZ-SORIANO et al., 2016; YANG et al., 2016). Em adição, além da presença de uma grande quantidade do elemento C como partículas, esta sintonização fina da razão sp² para sp³ nas partículas de carbono está relacionada também à fertilidade em longo prazo das terras escuras da Amazônia.

As partículas micrométricas à base de C, Ca e P que foram identificadas em grande quantidade nas amostras TMI-1 e TMI-2 podem atuar nos solos como sistemas de “estocagem” de carbono e nutrientes (HAYNES; NAIDU, 1998; TAUBE et al., 2013). No caso das partículas à base de carbono oxidadas, além delas fornecerem compostos orgânicos ao solo, elas também podem atuar no sequestro de C, Fe e Al em longo prazo e na estabilização de microrganismos (ATKINSON; FITZGERALD; HIPPS, 2010; YANG et al., 2016). Além disso, tais partículas podem possivelmente fornecer benefícios similares àqueles associados ao biocarvão, nos quais envolvem a melhoria do pH do solo e da capacidade de troca catiônica; a melhoria na estrutura do solo e da capacidade de retenção de água; e a diminuição da perda de nutrientes por lixiviação e escoamento (GLASER, 2014; LEHMANN, 2009; PAZ-FERREIRO et al., 2014; SOHI et al., 2010).

O aumento da produtividade de culturas devido a alterações do solo com o biocarvão, também tem sido atribuído à melhoria de fertilidade do solo mediante uma maior disponibilidade de nutrientes básicos, como o Ca e Mg em solos ácidos (GLASER; LEHMANN; ZECH, 2002; MAJOR et al., 2010); maior retenção de N e P e eficiência no uso de N (HOSSAIN et al., 2010; VAN ZWIETEN et al., 2010; ZHANG et al., 2010); maior atividade enzimática (PAZ-FERREIRO et al., 2012) e melhoria do regime de umidade do solo (ZHANG et al., 2012). Finalmente, como relatado previamente o aumento na produtividade de solos arenosos modificados com o biocarvão pode ser um resultado da estocagem aprimorada de matéria orgânica, na qual pode estar promovendo nos solos a agregação e retenção tanto de nutrientes quanto de umidade (GASKIN et al., 2010; OGUNTUNDE et al., 2004; VAN ZWIETEN et al., 2010). Essas propriedades detêm uma importância especial, considerando a perda e degradação do solo devido à agricultura, visto que ela reduz a quantidade de matéria orgânica no solo, a biodiversidade, a capacidade de retenção de água e

a própria vitalidade do solo na produção agrícola em todo o mundo (BRUUN et al., 2015; CERDÀ et al., 2009; COLAZO; BUSCHIAZZO, 2015; DE OLIVEIRA et al., 2015).

Em adição, sendo o P um dos nutrientes mais limitantes no que diz respeito ao crescimento de plantas, especialmente em solos ácidos altamente intemperados nos trópicos (VITOUSSEK; SANFORD, 1986), a presença de uma grande quantidade de partículas micrométricas à base desse elemento deve ser considerada na manifestação da alta fertilidade da TMI. Nas plantas, o macronutriente P desempenha grande importância para uma ampla gama de processos, incluindo a geração de energia, síntese de ácido nucléico, fotossíntese, glicólise, respiração, síntese e estabilidade de membrana, inativação/ativação de enzima, reações redox, sinalização, metabolismo de carboidrato e fixação de N (BIELESKI, 1973; RAGHOTHAMA; KARTHIKEYAN, 2005; SCHACHTMAN; REID; AYLING, 1998).

2.5 Conclusão

A fim de se avaliar por completo os componentes particulados de amostras de solos brasileiros, aplicou-se uma abordagem de imageamento de raios X de campo amplo por meio de um microscópio eletrônico de varredura (sem qualquer processamento químico das amostras), juntamente com a análise computacional dos mapas elementares resultantes em alta definição (4800 x 4800 pixels) relacionados aos elementos Al, C, Ca, Cr, F, Fe, Mg, Mn, Na, O, P, S, Si e Ti. A varredura eletrônica aqui realizada sobre uma área de 8 x 8 mm para cada amostra, possibilitou a detecção de >10.000 partículas nas imagens de campo amplo de todas as amostras estudadas. Ao se comparar a morfologia das partículas que constituem as amostras de ultissolo, oxissolo e de terra escura amazônica TMI, evidenciou-se a presença de grandes partículas (com uma área de seção transversal de até 100 μm^2), sendo a última composta por partículas de C, Ca e P. As partículas que constituem a TMI apresentaram uma distância média entre partículas mais próximas da ordem de 40-70 μm , enquanto o valor dessa grandeza para as amostras de oxissolo e ultissolo ficou na faixa de 170-600 μm . As descobertas realizadas aqui indicaram também que as partículas micrométricas à base de C encontradas na TMI não estão totalmente oxidadas, apoiando estudos anteriores feitos em escalas de comprimento menores (ou seja, do nanômetro ao micrômetro) que indicaram a presença de carbono grafítico sp^2 nessas partículas.

Além disso, o elemento Ca encontrou-se largamente presente nas amostras de TMI como partículas associado ao P, possivelmente na forma de fosfato. Dessa forma, apresentou-se por meio desta abordagem analítica uma “impressão digital” da morfologia e

estrutura das partículas do solo altamente fértil TMI, na qual deterá um grande impacto no que se refere à racionalidade de projetos de gerenciamento de solos. Sendo assim, com base nos resultados aqui relatados, pode-se objetivar uma fertilidade melhorada e sustentável a partir do controle da morfologia e estrutura das alterações dos solos que poderão atuar como sistemas de armazenamento, especialmente na liberação de carbono e nutrientes em longo prazo, tais como o fósforo. Por fim, esta abordagem de imageamento em múltiplas escalas de comprimento será de grande valia em estudos futuros sobre o envelhecimento e deterioração de solos, possibilitando a determinação da evolução da morfologia das partículas de solo em função do seu uso, o que acarreta em uma questão central sobre a garantia da segurança alimentar num futuro próximo.

Referências

ABBOTT L.K., M. D. V. What is soil biological fertility? In: **Soil Biological Fertility - A Key to Sustainable Land Use in Agriculture**. New York: Springer, 2007. p. 1–15.

ALLEN, M. J.; TUNG, V. C.; KANER, R. B. Honeycomb Carbon: A Review of Graphene. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 1, p. 132–145, 13 jan. 2010.

ANDRADE, N. F. et al. Temperature effects on the nitric acid oxidation of industrial grade multiwalled carbon nanotubes. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 7, p. 1761, 20 jul. 2013.

ARCHANJO, B. S. et al. Chemical Analysis and Molecular Models for Calcium–Oxygen–Carbon Interactions in Black Carbon Found in Fertile Amazonian Anthrosoils. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 13, p. 7445–7452, 11 jul. 2014.

ARCHANJO, B. S. et al. Nanoscale mapping of carbon oxidation in pyrogenic black carbon from ancient Amazonian anthrosoles. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 17, n. 4, p. 775–779, 2015.

ARYA, L. M.; PARIS, J. F. A Physicoempirical Model to Predict the Soil Moisture Characteristic from Particle-Size Distribution and Bulk Density Data1. **Soil Science Society of America Journal**, v. 45, n. 6, p. 1023, 8 set. 1981.

ATKINSON, C. J.; FITZGERALD, J. D.; HIPPS, N. A. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1–2, p. 1–18, 30 dez. 2010.

BIELESKI, R. L. Phosphate Pools, Phosphate Transport, and Phosphate Availability. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 225–252, 1973.

BRUUN, T. B. et al. Organic carbon dynamics in different soil types after conversion of forest to agriculture. **Land Degradation and Development**, v. 26, n. 3, p. 272–283, 2015.

- CERDÀ, A. et al. Soil erosion and agriculture. **Soil and Tillage Research**, v. 106, n. 1, p. 107–108, dez. 2009.
- CHAPARRO, J. M. et al. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 5, p. 489–499, 2012.
- CHEN, D.; FENG, H.; LI, J. Graphene Oxide: Preparation, Functionalization, and Electrochemical Applications. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 11, p. 6027–6053, 14 nov. 2012.
- COLAZO, J. C.; BUSCHIAZZO, D. The Impact of Agriculture on Soil Texture Due to Wind Erosion. **Land Degradation & Development**, v. 26, n. 1, p. 62–70, jan. 2015.
- DE OLIVEIRA, S. P. et al. Organic Carbon and Nitrogen Stocks in Soils of Northeastern Brazil Converted to Irrigated Agriculture. **Land Degradation and Development**, v. 26, n. 1, p. 9–21, 2015.
- DE SOUZA, A. M. et al. Validation of the near Infrared Spectroscopy Method for Determining Soil Organic Carbon by Employing a Proficiency Assay for Fertility Laboratories. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 24, n. 3, p. 293–303, jun. 2016.
- FARIA, A. F. et al. Unveiling the Role of Oxidation Debris on the Surface Chemistry of Graphene through the Anchoring of Ag Nanoparticles. **Chemistry of Materials**, v. 24, n. 21, p. 4080–4087, 13 nov. 2012.
- GASKIN, J. W. et al. Effect of Peanut Hull and Pine Chip Biochar on Soil Nutrients, Corn Nutrient Status, and Yield. **Agronomy Journal**, v. 102, n. 2, p. 623–633, mar. 2010.
- GILKES, R. J. Transmission Electron Microscope Analysis of Soil Materials. In: **Quantitative Methods in Soil Mineralogy**. Madison, WI, USA: Soil Science Society of America, 2015. p. 177–204.
- GIMÉNEZ, D. et al. Fractal models for predicting soil hydraulic properties: a review. **Engineering Geology**, v. 48, n. 3–4, p. 161–183, dez. 1997.
- GLASER, B. et al. The “Terra Preta” phenomenon: a model for sustainable agriculture in the humid tropics. **Naturwissenschaften**, v. 88, n. 1, p. 37–41, 7 jan. 2001.
- GLASER, B. Soil Biogeochemistry From Molecular to Ecosystem Level Using Terra Preta and Biochar as Examples. In: **Agroecology, Ecosystems, and Sustainability**. Boca Raton: CRC Press, 2014. p. 1–40.
- GLASER, B.; LEHMANN, J.; ZECH, W. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal - a review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, n. 4, p. 219–230, 1 jun. 2002.
- GUPTA, S. C.; LARSON, W. E. Estimating soil water retention characteristics from particle size distribution, organic matter percent, and bulk density. **Water Resources Research**, v. 15, n. 6, p. 1633–1635, dez. 1979.
- HASTIK, R.; GEITNER, C.; NEUBURGER, M. Amazonian Dark Earths in Bolivia? A soil

study of anthropogenic ring ditches near Baures (eastern Llanos de Mojos). **Erdkunde**, v. 67, n. 2, p. 137–149, 30 jun. 2013.

HAYNES, R. J.; NAIDU, R. Influence of lime, fertilizer and manure applications on soil organic matter. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 51, n. 123, p. 123–137, 1998.

HERNANDEZ-SORIANO, M. C. et al. Biochar affects carbon composition and stability in soil: a combined spectroscopy-microscopy study. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 25127, 26 jul. 2016.

HOSSAIN, M. K. et al. Agronomic properties of wastewater sludge biochar and bioavailability of metals in production of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Chemosphere**, v. 78, n. 9, p. 1167–1171, 2010.

HUGHES, R. E.; MOORE, D. M.; GLASS, H. D. Qualitative and Quantitative Analysis of Clay Minerals in Soils. In: **Quantitative Methods in Soil Mineralogy**. Madison, WI, USA: Soil Science Society of America, 2015. p. 330–359.

HUO, D.; YUSHENG, L. U.; KINGSTON, H. M. Determination and correction of analytical biases and study on chemical mechanisms in the analysis of Cr(VI) in soil samples using EPA protocols. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 21, p. 3418–3423, 1998.

JASTROW, J. D. Soil aggregate formation and the accrual of particulate and mineral-associated organic matter. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 4–5, p. 665–676, abr. 1996.

JÁUREGUI, O.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. . Liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for chlorinated phenolic compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 823, n. 1–2, p. 241–248, out. 1998.

JORIO, A. et al. Microscopy and spectroscopy analysis of carbon nanostructures in highly fertile Amazonian anthrosoils. **Soil and Tillage Research**, v. 122, p. 61–66, jun. 2012.

KAHLE, M.; KLEBER, M.; JAHN, R. Review of XRD-based quantitative analyses of clay minerals in soils: the suitability of mineral intensity factors. **Geoderma**, v. 109, n. 3–4, p. 191–205, out. 2002.

KERN, D. C.; KAMPF, N. O efeito de antigos assentamentos indígenas na formação de solos com terra preta arqueológicas na região de Oriximiná - PA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 13, n. 2, p. 219–225, 1989.

KRETZSCHMAR, R.; HOLTHOFF, H.; STICHER, H. Influence of pH and Humic Acid on Coagulation Kinetics of Kaolinite: A Dynamic Light Scattering Study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 202, n. 1, p. 95–103, jun. 1998.

LAL, R. Carbon Management in Agricultural Soils. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 12, n. 2, p. 303–322, 14 fev. 2007.

LEHMANN, J. et al. SOIL FERTILITY AND PRODUCTION POTENTIAL. In: **Amazonian Dark Earths: Origin, Properties, Management**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers,

2003. p. 105–124.

LEHMANN, J. Terra preta nova - Where to from here? **Amazonian Dark Earths: Wim Sombroek's Vision**, p. 473–486, 2009.

LI, S. et al. Distribution and storage of crop residue carbon in aggregates and its contribution to organic carbon of soil with low fertility. **Soil and Tillage Research**, v. 155, p. 199–206, jan. 2016.

MAJOR, J. et al. Maize yield and nutrition during 4 years after biochar application to a Colombian savanna oxisol. **Plant and Soil**, v. 333, n. 1, p. 117–128, 2010.

MALLEY, D. F. et al. Application of near-infrared spectroscopy in analysis of soil mineral nutrients. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 30, n. 7–8, p. 999–1012, 11 abr. 1999.

MEYER, S.; GLASER, B.; QUICKER, P. Technical, Economical, and Climate-Related Aspects of Biochar Production Technologies: A Literature Review. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 22, p. 9473–9483, 15 nov. 2011.

MOHAMMADI, M. H.; VANCLOOSTER, M. Predicting the Soil Moisture Characteristic Curve from Particle Size Distribution with a Simple Conceptual Model. **Vadose Zone Journal**, v. 10, n. 2, p. 594, 2011.

NGOLE-JEME, V.; EKOSSE, G.-I. A Comparative Analyses of Granulometry, Mineral Composition and Major and Trace Element Concentrations in Soils Commonly Ingested by Humans. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 8, p. 8933–8955, 31 jul. 2015.

NGUYEN, M. N. et al. Effect of anions on dispersion of a kaolinitic soil clay: A combined study of dynamic light scattering and test tube experiments. **Geoderma**, v. 209–210, p. 209–213, nov. 2013.

NGUYEN, M. N. et al. Silicic acid as a dispersibility enhancer in a Fe-oxide-rich kaolinitic soil clay. **Geoderma**, v. 286, p. 8–14, jan. 2017.

NORONHA, V. T. et al. Influence of Surface Silanization on the Physicochemical Stability of Silver Nanocoatings: A Large Length Scale Assessment. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 121, n. 21, p. 11300–11311, 17 jun. 2017.

OGUNTUNDE, P. G. et al. Effects of charcoal production on maize yield, chemical properties and texture of soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, n. 4, p. 295–299, 2004.

OLIVEIRA, N. C. et al. Large-Field Electron Imaging and X-ray Elemental Mapping Unveil the Morphology, Structure, and Fractal Features of a Cretaceous Fossil at the Centimeter Scale. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 19, p. 10088–10095, 6 out. 2015.

OLIVEIRA, N. C. et al. Morphological analysis of soil particles at multiple length-scale reveals nutrient stocks of Amazonian Anthrosols. **Geoderma**, v. 311, n. August 2017, p. 58–66, fev. 2018.

- PASCAUD, G. et al. Molecular fingerprint of soil organic matter as an indicator of pedogenesis processes in Technosols. **Journal of Soils and Sediments**, v. 17, n. 2, p. 340–351, 19 fev. 2017.
- PAULA, A. J. et al. Surface Chemistry in the Process of Coating Mesoporous SiO₂ onto Carbon Nanotubes Driven by the Formation of Si–O–C Bonds. **Chemistry – A European Journal**, v. 17, n. 11, p. 3228–3237, 7 mar. 2011.
- PAZ-FERREIRO, J. et al. Soil biochemical activities and the geometric mean of enzyme activities after application of sewage sludge and sewage sludge biochar to soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 5, p. 511–517, 21 jul. 2012.
- PAZ-FERREIRO, J. et al. Preface: Environmental benefits of biochar. **Solid Earth**, v. 5, n. 2, p. 1301–1303, 15 dez. 2014.
- QIAN, J. et al. Evaluation of plant availability of soil trace metals by chemical fractionation and multiple regression analysis. **Environmental Pollution**, v. 91, n. 3, p. 309–315, 1996.
- RAGHOTHAMA, K. G.; KARTHIKEYAN, A. S. Phosphate Acquisition. **Plant and Soil**, v. 274, n. 1–2, p. 37–49, jul. 2005.
- RIBEIRO-SOARES, J. et al. The use of Raman spectroscopy to characterize the carbon materials found in Amazonian anthrosoils. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 44, n. 2, p. 283–289, fev. 2013.
- RINNAN, R.; RINNAN, Å. Application of near infrared reflectance (NIR) and fluorescence spectroscopy to analysis of microbiological and chemical properties of arctic soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 7, p. 1664–1673, 2007.
- ROS, T. G. et al. Surface oxidation of carbon nanofibres. **Chemistry - A European Journal**, v. 8, n. 5, p. 1151–1162, 2002.
- ROSCOE, R. Tillage effects on soil organic matter in density fractions of a Cerrado Oxisol. **Soil and Tillage Research**, v. 70, n. 2, p. 107–119, abr. 2003.
- SANTOS, H. G. DOS. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 3^a ed. Brasília: Embrapa, 2013.
- SATO, S. et al. Biogenic calcium phosphate transformation in soils over millennial time scales. **Journal of Soils and Sediments**, v. 9, n. 3, p. 194–205, 9 jun. 2009.
- SCHACHTMAN, D. P.; REID, R. J.; AYLING, S. M. Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. **Plant Physiology**, v. 116, n. 2, p. 447–453, 1998.
- SOHI, S. P. et al. A review of biochar and its use and function in soil. **Advances in Agronomy**, v. 105, n. 1, p. 47–82, 2010.
- SOUSA, F. et al. Silver Nanocoatings at Large Length Scales: Influence of the AgNPs Morphology and Capping Agents on the Coating Chemical Stability and Antimicrobial Effect.

Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 28, n. 9, p. 1639–1649, 2016.

STEINER, C. Soil charcoal amendments maintain soil fertility and establish a carbon sink-research and prospects. **Soil Ecology Research Developments**, p. 105–110, 2007.

TAUBE, P. S. et al. Organic geochemical evaluation of organic acids to assess anthropogenic soil deposits of Central Amazon, Brazil. **Organic Geochemistry**, v. 58, p. 96–106, maio 2013.

UDELHOVEN, T.; EMMERLING, C.; JARMER, T. Quantitative analysis of soil chemical properties with diffuse reflectance spectrometry and partial least-square regression: A feasibility study. **Plant and Soil**, v. 251, n. 2, p. 319–329, 2003.

USDA. Keys to Soil Taxonomy, 12th ed. **Change**, v. 12, p. 327–328, 2014.

VALENTE, G. J. S. S.; COSTA, M. L. Fertility and desorption capacity of Anthrosols (Archaeological Dark Earth - ADE) in the Amazon: The role of the ceramic fragments (sherds). **Applied Clay Science**, v. 138, p. 131–138, mar. 2017.

VAN REEUWIJK, L. P. **Procedures for soil analysis**. sixth edit ed. Wageningen: International Soil Reference and Information Centre, 2002.

VAN ZWIETEN, L. et al. A glasshouse study on the interaction of low mineral ash biochar with nitrogen in a sandy soil. **Australian Journal of Soil Research**, v. 48, n. 6–7, p. 569–576, 2010.

VILLAVERDE, J. et al. The Kinetics of Sorption by Retarded Diffusion into Soil Aggregate Pores. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 21, p. 8227–8232, nov. 2009.

VITOUSSEK, P. M.; SANFORD, R. L. Nutrient cycling in moist tropical forest. **Annual review of ecology and systematics**. Vol. 17, p. 137–167, 1986.

WALKER, T. W.; SYERS, J. K. The fate of phosphorus during pedogenesis. **Geoderma**, v. 15, n. 1, p. 1–19, jan. 1976.

WANG, L. et al. Stimulatory effect of exogenous nitrate on soil denitrifiers and denitrifying activities in submerged paddy soil. **Geoderma**, v. 286, p. 64–72, 2017.

XINDE, C.; XIAORONG, W.; GUIWEN, Z. Assessment of the bioavailability of rare earth elements in soils by chemical fractionation and multiple regression analysis. **Chemosphere**, v. 40, n. 1, p. 23–28, 2000.

YANG, F. et al. The Interfacial Behavior between Biochar and Soil Minerals and Its Effect on Biochar Stability. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 5, p. 2264–2271, 18 mar. 2016.

YIN, Y. et al. Soil Aggregate Stability and Iron and Aluminium Oxide Contents Under Different Fertiliser Treatments in a Long-Term Solar Greenhouse Experiment. **Pedosphere**, v. 26, n. 5, p. 760–767, out. 2016.

ZHANG, A. et al. Effect of biochar amendment on yield and methane and nitrous oxide

emissions from a rice paddy from Tai Lake plain, China. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 139, n. 4, p. 469–475, 2010.

ZHANG, A. et al. Effect of biochar amendment on maize yield and greenhouse gas emissions from a soil organic carbon poor calcareous loamy soil from Central China Plain. **Plant and Soil**, v. 351, n. 1–2, p. 263–275, 2012.

3 UMA ALTERNATIVA PARA A PRODUÇÃO DE FILMES HÍBRIDOS DE BORRACHA NATURAL-FOSFATO DE CÁLCIO PARA APLICAÇÕES COMO REVESTIMENTOS BIOATIVOS

3.1 Introdução

A borracha natural (BN) obtida a partir do látex de *Hevea brasiliensis* é altamente procurada pela indústria manufatureira devido à superioridade de suas propriedades quando comparada a borracha sintética. No entanto, com o intuito de expandir o seu potencial para novas aplicações, o desenvolvimento de novos compósitos combinando a BN a outros materiais é alvo atual de muitas pesquisas (DICK; DOS SANTOS, 2017; WISUTIRATANAMANEE; POOCHINDA; POOMPRADUB, 2017; YU et al., 2016). Em geral, tais sistemas híbridos apresentam propriedades novas e superiores, como por exemplo, tem sido estudado um compósito à base de BN-grafeno a fim de se obter um material com alta condutividade elétrica combinada as propriedades de flexibilidade do polímero (ZHAN; MENG; LI, 2017). A Biomedicina também é um campo promissor para aplicações de materiais à base de borracha natural (ABRAHAM et al., 2012; ARAUJO; MASSUDA; HYPOLITO, 2012; BORGES et al., 2015, 2017; DANNA et al., 2016; ERENO et al., 2010; FERREIRA et al., 2009; FLORIANO et al., 2014; HERCULANO et al., 2011; MOURA et al., 2014; PICHAYAKORN et al., 2013).

Materiais compostos ou materiais híbridos à base de fosfato de cálcio (CaP) e BN apresentam um grande potencial, especialmente para aplicações como (ou associados com) implantes. Entretanto, antes de se alcançar produtos a nível comercial, produção de biomateriais ou compósitos para aplicações biomédicas, se faz necessário elucidar aspectos relevantes ao processamento da BN. Uma questão a ser esclarecida inclui os possíveis efeitos do conteúdo de amônia, utilizada para evitar a coagulação espontânea do látex, além de ser muito importante para a sua preservação (SANTIPANUSOPON; RIYAJAN, 2009), na morfologia e estrutura química das partículas de BN presentes na fase creme do látex. Adicionalmente, nos compósitos, as interações moleculares entre os constituintes não borracha e as partículas carregadas do creme de BN também não foram devidamente descritas até o momento.

Para o caso de partículas de CaP carregadas dispersas na fase de BN, a sugestão da distribuição homogênea e randômica de diferentes grupos moleculares correlacionados com duas bandas de emissão no espectro de fotoluminescência não são reprodutíveis para a

testagem dos modelos de distribuição heterogênea de proteínas e fosfolipídios (BERTHELOT et al., 2014; NAWAMAWAT et al., 2011; RIPPEL et al., 2005). Nesse sentido, se faz necessário o emprego de novas técnicas e abordagens que promovam uma melhoria ao processo de hibridização da BN, buscando explorar por completo a matriz polimérica com a finalidade de projetar um material funcional com propriedades otimizadas.

Recentemente, NASCIMENTO et al. descreveu na literatura uma pesquisa sobre a produção de membranas híbridas de BN-CaP formadas a partir de métodos de *casting* utilizando partículas biocerâmicas de CaP dispersas em suspensões coloidais de BN (NASCIMENTO et al., 2014). As membranas conjugaram as propriedades favoráveis de biocompatibilidade do CaP com as características renováveis e de baixo custo da BN. Por sua vez, o presente trabalho descreve a produção e caracterização de revestimentos híbridos formados a partir da BN-CaP, bem como a sua estabilidade físico-química na presença de um fluido corporal simulado (SBF, do inglês *simulated body fluid*), sendo que este possui uma alta relevância no desenvolvimento de revestimentos para implantes. Os aspectos morfológicos e estruturais da BN processada, antes e depois da incorporação do CaP, foram avaliados por meio da aplicação de ensaios físico-químicos, técnicas de imageamento espectroscópico, eletrônico e vibracional. Aqui, investigou-se também a influência do conteúdo de amônia nos produtos finais. E as interfaces orgânico-inorgânicas do híbrido de BN-CaP foram caracterizadas por espectroscopia molecular.

Neste trabalho, realizou-se também a investigação dos grupos químicos funcionais responsáveis pela formação da estrutura *core-shell* (núcleo-casca) que aprisiona as partículas biocerâmicas (CaP). Sendo a estrutura química do polímero natural, o ambiente microquímico na interface BN-CaP e a morfologia dos aglomerados totalmente descritos aqui. Avaliou-se também a resposta do revestimento híbrido de BN-CaP expondo-o ao SBF através da incubação das amostras por um período de 30 dias. A notável estabilidade do mesmo no substrato de silício (Si) e suas modificações superficiais devido à exposição ao ambiente biológico, bem como a biodegradabilidade em diferentes níveis em relação à dependência temporal, são discutidas neste trabalho objetivando possíveis aplicações do material no campo biomédico, como por exemplo, no revestimento de biomateriais e em sistemas de liberação controlada de drogas.

3.2 Procedimentos Experimentais

3.2.1 Separação do creme de borracha natural

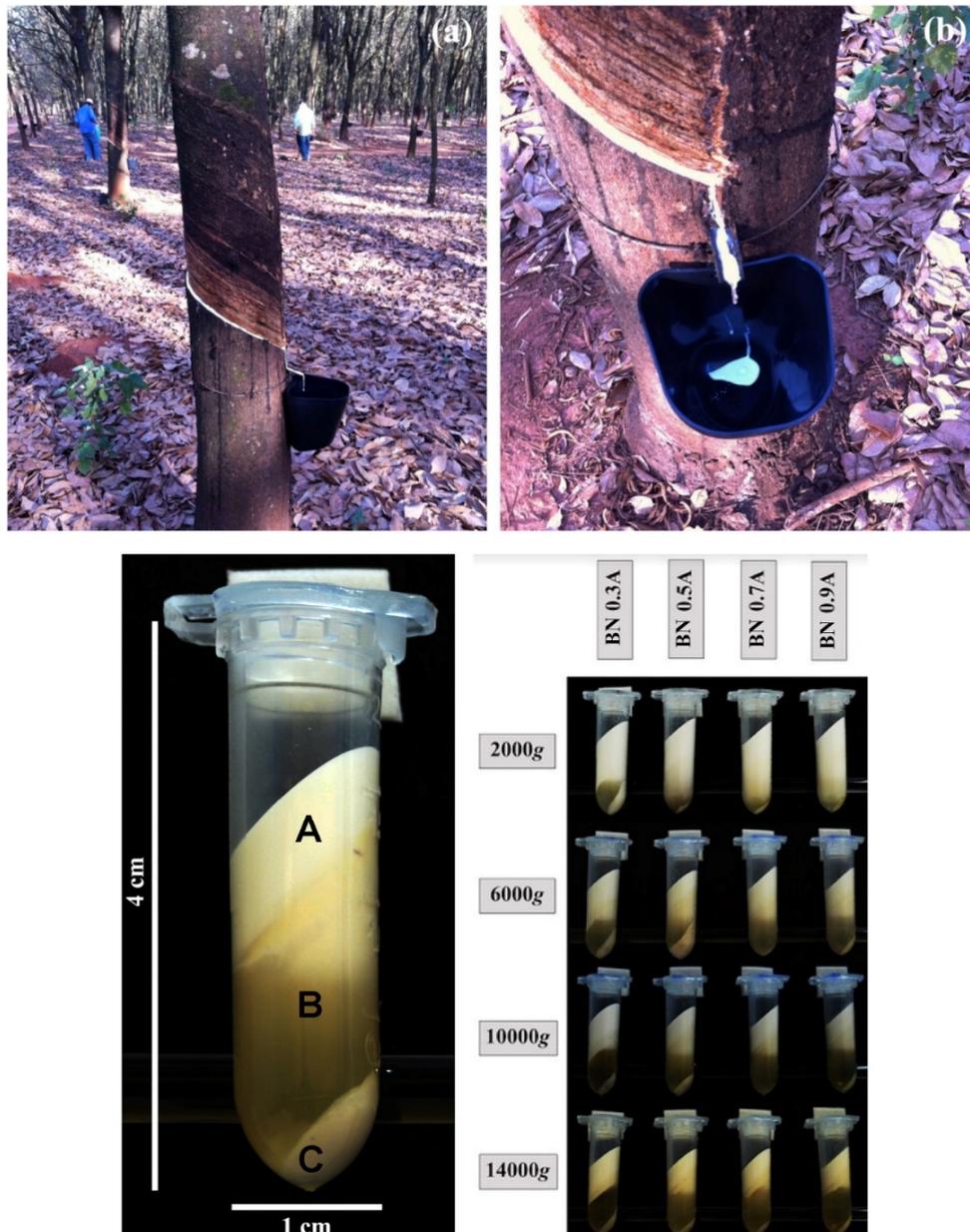
As amostras do látex de borracha natural (LBN) foram coletadas de árvores de *Hevea brasiliensis* (clone RRIM 600) localizadas na fazenda Estância Regina, São Paulo, Brasil, ver Figura 10. Após a coleta, as amostras foram imediatamente transferidas para tubos de polipropileno contendo diferentes quantidades de amônia, levando a concentrações finais de amônia de 0,3%, 0,5%, 0,7% e 0,9% m/m (as amostras foram denotadas aqui como BN 0,3A, BN 0,5A, BN 0,7A e BN 0,9A, respectivamente) e em seguida, estocadas sob refrigeração a 4 °C para evitar a contaminação microbiana. Inicialmente, alíquotas de 1,5 mL de cada amostra com diferentes conteúdos de amônia foram adicionadas a tubos de microcentrifugação de 2 mL e, por conseguinte, centrifugadas por 90 min a 24 °C em um centrífuga *Eppendorf* 5418 R. Para cada amostra, foram empregadas quatro diferentes velocidades de centrifugação: 2000g, 6000g, 10000g e 14000g. E ao final do processo, os microtubos foram fotografados com uma câmera fotográfica *Nikon* D3200 a fim de se comparar o efeito da velocidade de centrifugação na separação das fases do LBN.

A Figura 10 mostra a típica aparência do LBN centrifugado: (A) fase creme, contém partículas de BN concentradas; (B) fração soro, possui uma alta proporção de água, assim como partículas de borracha e componentes não borracha; e (C) contém lutóides (THEPCHALERM et al., 2015). Após a separação, coletou-se uma parte da fase superior (creme) das amostras centrifugadas a 2000g com uma espátula, sendo redispersas, em seguida, em água deionizada para as análises de tamanho de partículas através do espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *dynamic light scattering*). As dispersões de partículas de BN em água deionizada obtiveram uma concentração final de 0,011% m/m e as medidas de DLS foram realizadas em um *Zetasizer Nano ZS*, *Malvern Instruments Ltd*, *Malvern*, UK.

Para verificar se a estrutura das amostras de BN são modificadas pelo conteúdo de amônia e pelo processo de centrifugação, elas foram investigadas pela espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier modo reflexão total atenuada (ATR-FTIR, do inglês *Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared*). Os espectros de ATR-FTIR foram gravados pelo software OPUS em um espectrômetro *Bruker Vertex 70v*. O sistema foi equipado com uma fonte Global utilizada na região do infravermelho médio (MIR, do inglês *Middle Infrared Region*) e um detector DLaTGS. Os espectros foram gravados na faixa de

4000-1400 cm^{-1} com uma resolução de 2 cm^{-1} . Mediu-se o *background* antes de se analisar cada amostra e, gravou-se um espectro para cada cinco regiões distintas de uma mesma amostra; onde cada espectro foi obtido a partir de 256 varreduras sucessivas. Sendo, portanto, os espectros finais de ATR-FTIR a média de cinco espectros adquiridos em regiões distintas. Esta primeira avaliação forneceu parâmetros para enriquecer a fração creme de BN e para diminuir a quantidade de água na BN seca (após o processo de centrifugação).

Figura 10 - Processos de coleta e separação do látex: vista lateral da coleta do látex da árvore *Hevea brasiliensis*, vista frontal da coleta do látex em um frasco apropriado, apresentação visual do látex depois do processo de centrifugação mostrando a (a) fração creme, (b) fração soro e (c) lutóides em diferentes concentrações de amônia e forças centrífugas.



Fonte: Adaptado de DO NASCIMENTO et al. (2019, p. 419).

3.2.2 Produção dos revestimentos híbridos de BN-CaP

As amostras de BN utilizadas na produção dos revestimentos híbridos foram extraídas por centrifugação a uma velocidade de 14000g por 90 min. Após o processo de centrifugação, secou-se o creme de BN em estufa a 45 °C por 24 h e, em seguida, ele foi solubilizado em clorofórmio por 2 dias. Os pós-cerâmicos bioativos à base de CaP, tiveram sua viabilidade celular descrita por DO NASCIMENTO et al. (2017), contendo Ca_5P_8 (47,8%), $\text{Ca}(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (9,5%), CaCO_3 (36,3%) e Ca (6,3%) foram misturados na suspensão do creme de BN (em clorofórmio) sob agitação magnética por 30 min.

Em adição, os substratos de silício de 5 x 5 mm com superfícies polidas foram limpos sequencialmente em banho ultrassônico com acetona, álcool isopropílico e água ultrapura (por 15 min em cada etapa) e finalmente secos a 50 °C por 10 min. A BN e as suspensões de BN-CaP em clorofórmio (30 μL) foram depositadas controladamente nos substratos e os mesmos secos por 12 h a 60 °C, assim gerando as amostras de revestimentos de Si/BN e Si/BN-CaP. Os efeitos das cargas dos revestimentos foram avaliados por meio da determinação da componente polar da energia livre γ_s^p utilizando os seguintes líquidos: água ultrapura ($\gamma^p = 51 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^d = 21,8 \text{ mJ/m}^2$ e $\gamma = 72,8 \text{ mJ/m}^2$), formamida ($\gamma^p = 18,5 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^d = 39,5 \text{ mJ/m}^2$ e $\gamma = 58 \text{ mJ/m}^2$), etilenoglicol ($\gamma^p = 19 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^d = 29 \text{ mJ/m}^2$ e $\gamma = 48 \text{ mJ/m}^2$), di-iodometano ($\gamma^p = 0 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^d = 50,8 \text{ mJ/m}^2$ e $\gamma = 50,8 \text{ mJ/m}^2$) e hexadecano ($\gamma^p = 0 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^d = 27,47 \text{ mJ/m}^2$ e $\gamma = 27,47 \text{ mJ/m}^2$). E a partir das medidas dos ângulos de contato, obteve-se o plote de $0,5 \gamma_L(1 + \cos\theta) \cdot (\gamma^d)^{-1/2}$ versus $(\gamma^p/\gamma^d)^{1/2}$ para a determinação da componente polar da energia livre γ_s^p .

3.2.3 Incubação em fluido corporal simulado

O meio de SBF foi obtido através da dissolução de 0,2 g de KCl, 8,0 g de NaCl, 0,2 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,05 de NaH_2PO_4 , 1,0 g de NaHCO_3 , 0,1 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 1,0 g de glucose em 1 L de água ultrapura sob pH constante (7,45). Dois protocolos foram avaliados para este estudo, visando à otimização e reprodutibilidade dos resultados. O protocolo escolhido e utilizado aqui, preveniu a nucleação precoce e a precipitação de sais. Ambos os revestimentos (BN e BN-CaP) e o meio de SBF foram esterilizados em UV por 15 min antes da etapa de incubação. Vale ressaltar, que se utilizou também um substrato de Si limpo, sem revestimento, como controle e que todos os substratos foram pesados em uma balança analítica antes de cada experimento. As amostras foram então imersas em poços contendo 5

mL de SBF e mantidas a 37,5 °C por diferentes períodos de tempo, ou seja, 1 (um), 15 (quinze) e 30 (trinta) dias. Após cada intervalo de tempo, os substratos foram coletados e gentilmente limpos em água ultrapura. Sendo em seguida, mantidos em um dessecador por 24 h e posteriormente, tendo suas massas aferidas em uma balança.

As amostras de Si, Si/BN e Si/BN-CaP foram nomeadas em função do tempo (#1, #15 e #30), totalizando 9 grupos de superfícies. Após a remoção dos substratos do SBF, evaporou-se o meio utilizado na incubação das amostras #30 (com 30 dias de imersão) até um volume de 0,5 mL e logo depois, ele foi gotejado em lâminas de vidro e seco a 37 °C. Essas novas três amostras (SBF/Si, SBF/Si/BN e SBF/Si/BN-CaP) foram analisadas em relação as suas composições. Os experimentos de imersão em SBF foram repetidos por pelo menos 5 vezes e os resultados são fornecidos como valores médios e com seus respectivos desvios padrões. Para cada dia (1, 15 e 30), as amostras de Si, BN e BN-CaP foram comparadas pela abordagem estatística Kruskal-Wallis.

3.2.4 Caracterizações física e química

A espectroscopia Raman confocal e o mapeamento espectral Raman foram empregados na sondagem da fase das partículas encapsuladas no híbrido de BN-CaP através dos perfis XYZ das bandas vibracionais. Os espectros e o mapeamento espectral Raman foram obtidos utilizando-se um microscópio WITec *alpha* 300 equipado com um estágio linear, piezo-dirigido, com lentes objetivas da Nikon de 20x (NA = 0,46) e 100x (NA = 0,8) e com laser de excitação de 514 ou 632 nm de comprimento de onda. A luz Raman foi detectada por uma CCD espectroscópica retroiluminada de alta sensibilidade após ser dispersa por uma grade de 600 ranhuras/mm. Por meio dos mapeamentos Raman investigou-se também a interface orgânico-inorgânica através dos perfis de profundidade XY em dois planos ($Z = 0$ e $Z = 2,6$ mm) realizados em uma região de 30 x 30 μm com 60 pontos por linha e 60 linhas por imagem. O tempo de integração para cada ponto foi de 0,5 s e todos os mapeamentos foram realizados a temperatura ambiente.

Tanto as amostras de BN como as de SBF secas foram analisadas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS, do inglês *dispersive energy X-Ray spectroscopy*) através da varredura eletrônica de campo amplo. Os experimentos foram realizados em um microscópio Quanta 450, FEI, equipado com um canhão de emissão de campo, estágio de 100 mm e um detector de raios X modelo 150, Oxford. A geração das imagens de campo amplo foi realizada através da

sobreposição de áreas das imagens adjacentes adquiridas independentemente após os movimentos do estágio do microscópio eletrônico nos eixos XY.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Avaliação morfológica e estrutural das partículas de BN

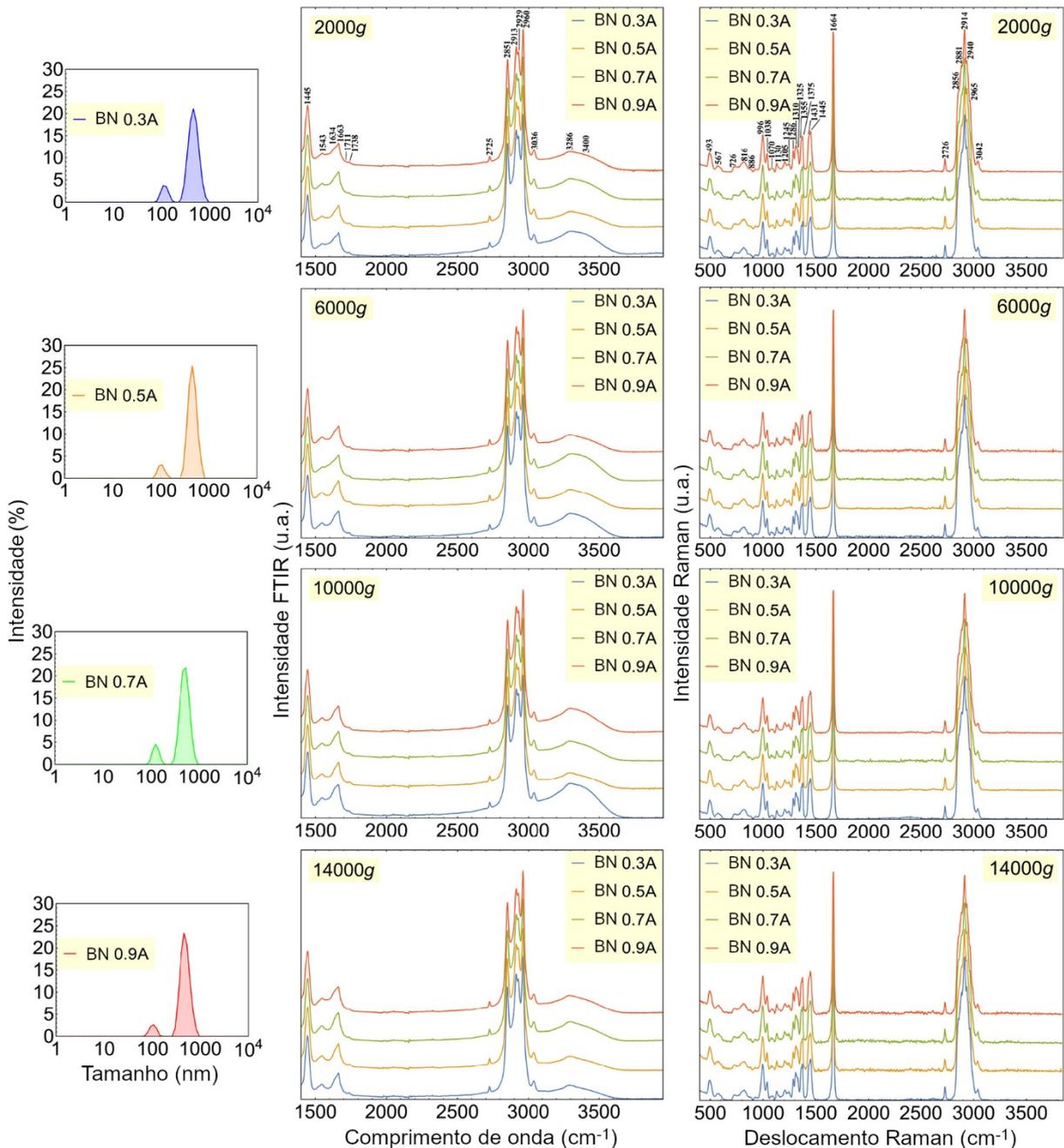
O látex fresco, tal como extraído da planta, é muito suscetível à contaminação microbiana. Por este motivo, adiciona-se amônia ao látex para aumentar o pH e, portanto, diminuir a atividade microbiana e prevenir sua coagulação mesmo quando armazenado por um longo período de tempo (mais de um ano). A fim de verificar os efeitos da amônia na estrutura química do creme e na morfologia das partículas de BN, as amostras BN 0,3A, BN 0,5A, BN 0,7A e BN 0,9A foram submetidas a diferentes forças centrífugas. A amostra contendo 0,3% m/m de amônia (BN 0,3A) mostra uma fase creme larga em todas as centrifugações, avaliada em termos do volume de látex no microtubo.

Por outro lado, as amostras BN 0,5A, BN 0,7A e BN 0,9A mostram um volume de creme semelhante. Na velocidade de 2000g, a área da fase creme é maior quando comparada as outras amostras. Porém, a 6000g, 10000g e 14000g, a fase creme permanece a mesma em relação ao seu volume. Além disso, uma baixa força centrífuga leva a um maior nível de turbidez na fase soro, enquanto uma elevada força centrífuga leva a uma fase soro transparente, ver Figura 10. Esses resultados indicam que uma melhor separação entre as fases orgânica (BN) e líquida (soro) acontece a 14000g. A Figura 11 mostra os resultados de DLS realizados nas amostras, as quais exibiram distribuições bimodais no tamanho das partículas variando de 60-190 nm e 220-1000 nm. A partir dos resultados coletados de todas as amostras, observou-se que a variação na concentração de amônia não ocasionou mudanças significativas na distribuição final do tamanho das partículas.

A Figura 11 também mostra uma comparação entre os espectros de ATR-FTIR e Raman do *cis*-1,4-poliisopreno das amostras de BN, ou seja, da fase creme centrifugada e seca com diferentes concentrações de amônia obtida a partir de diferentes forças de centrifugação. Ambos os espectros ATR-FTIR e Raman exibiram as mesmas bandas características da estrutura macromolecular da BN, independentemente do conteúdo de amônia adicionado e da velocidade de centrifugação utilizada. Os espectros de alguns componentes não-isopreno do *cis*-1,4-poliisopreno mostram bandas em 1665 cm^{-1} que se referem a um grupo funcional

específico, relacionado à existência de material proteico (LU; HSU, 1987; ROLERE et al., 2015).

Figura 11 - (a) Resultado do espalhamento dinâmico de luz das amostras de BN com diferentes concentrações de amônia. Comparação dos espectros de (b) FTIR-ATR e (c) Raman do *cis*-1,4-poliisopreno das amostras de BN com diferentes concentrações de amônia obtidas a partir de diferentes velocidades de centrifugação. Cada espectro mostrado nos painéis (b) e (c) representa a média entre três espectros diferentes para cada amostra.



Fonte: Adaptado de DO NASCIMENTO et al. (2019, p. 420).

Duas bandas entre 3500-3200 cm^{-1} foram observadas para todas as amostras de BN. A banda em 3400 cm^{-1} é designada pela vibração de estiramento da água, podendo estar relacionada à estrutura proteica (BARTH, 2007). A banda em 3283 cm^{-1} , estiramento da ligação N-H, é atribuída às amins provenientes das proteínas. E a banda em 1738 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da carbonila, relacionada aos grupos dos ésteres, pode ser descrita pelas espécies ligadas por hidrogênio (LU; HSU, 1987); a banda em 1711 cm^{-1} é designada pelo estiramento da carbonila de grupos carboxilas. As bandas em 1630 e 1541 cm^{-1} (amida I e amida II, respectivamente) atribuídas aqui às proteínas e polipeptídios da BN, vêm de ligações peptídicas (BARTH, 2007; ROLERE et al., 2015). As posições completas e as atribuições das bandas observadas nos espectros de ATR-FTIR e Raman das amostras de BN são fornecidas na Tabela 5 e 6.

Tabela 5 - Atribuições das bandas observadas nos espectros de ATR-FTIR medidas para os componentes não-isopreno do *cis*-1,4-poliisopreno das amostras de BN com diferentes concentrações de amônia obtidas a partir das diferentes velocidades de centrifugação utilizadas.

Frequência (cm^{-1})		Atribuição
Literatura	Neste trabalho	
3400	3400	Estiramento O-H (<i>Proteínas</i>)
3283	3286	Estiramento N-H (<i>Proteínas</i>)
1748-1738	1738	Estiramento $R_1-(C=O)-O-R_2$ (<i>Lipídios</i>)
1711	1711	Estiramento $R_1-(C=O)-OH$ (<i>Lipídios</i>)
1630	1634	Amida I : estiramento $R_1-(C=O)-NH-R_2$ (<i>Proteínas</i>)
1541	1543	Amida II : dobramento no plano N-H + estiramento C-N (<i>Proteínas</i>)

Fonte: Adaptado de DO NASCIMENTO et al. (2019).

Considerando os resultados do volume da fase creme, maior para a amostra BN 0,3A centrifugada a 14000g, a morfologia das partículas de BN (semelhante para todas as concentrações de amônia) e a estrutura química da fase creme seca (semelhante para todas as concentrações e velocidades de centrifugação), optou-se por preparar os híbridos BN-CaP a partir da BN extraída das suspensões do látex bruto conservadas com 0,3% de amônia (m/m) e centrifugada a 14000g por 90 min.

Tabela 6 - Posições e atribuições das bandas do *cis*-1,4-poliisopreno observadas nos espectros Raman das amostras de BN com diferentes concentrações de amônia obtidas a partir de diferentes velocidades de centrifugação utilizadas.

Deslocamento Raman (cm ⁻¹)		Atribuição
Literatura	Neste trabalho	
3033	3042	Estiramento =CH
2965	2965	Estiramento assimétrico CH ₃
2940	2940	Estiramento assimétrico CH ₂
2911	2914	Estiramento simétrico CH ₃
2880	2881	Estiramento simétrico CH ₂
2853	2856	Estiramento simétrico CH ₃
2724	2726	<i>Não identificado</i>
1664	1664	Estiramento C=C
1445	1445	Deformação CH ₂
1431	1431	Deformação CH ₂
1375	1375	Deformação assimétrica CH ₃
1357	1355	Deformação assimétrica CH ₃
1327	1325	Deformação simétrica CH ₃
1308	1310	Balanço CH ₂
1286	1286	Dobramento no plano =CH
1243	1245	Torção CH ₂
1201	1205	Balanço CH ₂
1130	1130	Estiramento C-C
1070	1070	Torção CH ₂
1038	1038	Rotação CH ₃
996	996	Estiramento C-C
889	886	Balanço CH ₃
816	816	Dobramento fora do plano =CH
728	726	Rotação CH ₂
565	567	Deformação C-C-C
493	493	Deformação C-C-C

Fonte: Adaptado de DO NASCIMENTO et al. (2019).

3.3.2 Caracterização dos híbridos BN-CaP e suas propriedades de encapsulamento

A capacidade de encapsulamento da BN foi investigada com o intuito de aplicar o híbrido de BN-CaP como um revestimento funcional em biomateriais, pelo monitoramento da impressão digital molecular da BN após a incorporação das partículas biocerâmicas de CaP. A Figura 12 mostra os espectros Raman adquiridos utilizando-se uma fonte de excitação com $\lambda = 532$ nm, a temperatura ambiente, antes e depois de incorporar o CaP ao polímero natural. A presença das partículas de CaP parecem não afetar os principais grupos químicos da matriz de BN. Os espectros Raman das amostras exibiram os picos característicos da estrutura macromolecular da BN, juntamente com os picos das moléculas de água adsorvidas/incorporadas na matriz e também relacionadas aos modos vibracionais do CaP.

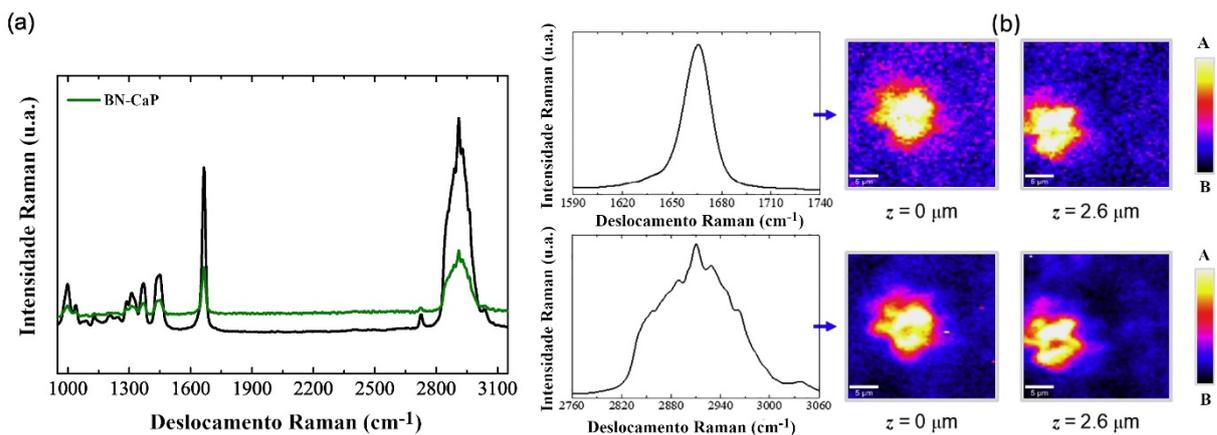
As bandas na faixa espectral de $2820-3030\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao estiramento C-H do CH_2 e CH_3 (SIMOES et al., 2005), características dos grupos de cadeia *cis*-poliisopreno. Além disso, essa é uma região espectral de cadeias fosfolipídicas caracterizada pelos modos de estiramento simétrico e antissimétrico e, reforçada pela ressonância de Fermi (GABER; PETICOLAS, 1977; LHERT et al., 2000; SNYDER; HSU; KRIMM, 1978). Essa região espectral também exhibe as bandas de estiramento vibracional C-H dos aminoácidos, relacionados com a presença de estruturas proteicas incorporadas à matriz de BN. No entanto, considerando-se a concentração dos constituintes acima mencionados, a maior contribuição para as bandas em $2820-3030\text{ cm}^{-1}$ é da BN.

A banda na região de $1660-1680\text{ cm}^{-1}$ é atribuída ao estiramento C=C, vibração característica de hidrocarbonetos. As bandas em 1450 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} são assinadas pelo modo de deformação C-H e pelas vibrações de torção dos anéis [$t(\text{CH}_2)$], respectivamente (LHERT et al., 2000). As vibrações dos anéis são uma característica da amida II-III, presentes também na estrutura proteica e associadas com o estiramento C-N acoplado e as vibrações de dobramento N-H (RYGULA et al., 2013). As bandas em 1000 cm^{-1} são atribuídas ao modo de respiração dos aminoácidos fenilalanina-aromáticos, bem como ao modo de estiramento de P-O que será discutido em maiores detalhes a seguir.

A Figura 12 exhibe um mapeamento espectral Raman coletado a partir dos perfis XY de profundidade Z de um aglomerado de BN-CaP. Os perfis de intensidade foram adquiridos com bandas centralizadas em (a) 2912 cm^{-1} e (b) 1665 cm^{-1} . As imagens revelaram detalhes da distribuição química na qual a camada está exposta na superfície. Observa-se o estiramento C-H no centro do aglomerado em alta intensidade. Esse centro parece uma forma irregular que se ajusta às formas das partículas de CaP. As partículas foram então “fatiadas”

pelo plano confocal da superfície (XY) e em todas as secções retas (μm) o topo dos aglomerados foi revelado. A impressão digital molecular é atribuída à estrutura *core-shell* composta por moléculas de isopreno, cercadas por camadas de proteínas ($\sim 85\%$) e fosfolípidios ($\sim 15\%$) (PICHAYAKORN et al., 2013; SANTIPANUSOPON; RIYAJAN, 2009), onde o processo de aprisionamento é atribuído à atração entre partículas não borracha e partículas de CaP durante a etapa do processamento do material. Como uma consequência, o processo de encapsulamento induz a redução da carga superficial em 35%, como atestado pela diminuição da componente polar da energia livre γ_s^p .

Figura 12 - Caracterização dos híbridos de BN-CaP: (a) espectros Raman obtidos com $\lambda = 514$ nm de excitação, em temperatura ambiente, antes (preto) e depois (verde) da incorporação do CaP, (b) mapeamento espectral Raman obtido a partir dos perfis de profundidade XY com planos em $Z = 0$ (topo do aglomerado) e $Z = -2,6 \mu\text{m}$. Os perfis de intensidade foram adquiridos tomando os picos em 1665 cm^{-1} e 2990 cm^{-1} com uma lente objetiva de 20x. A escala de cor nos painéis varia de baixa (B) a alta (A) intensidade.



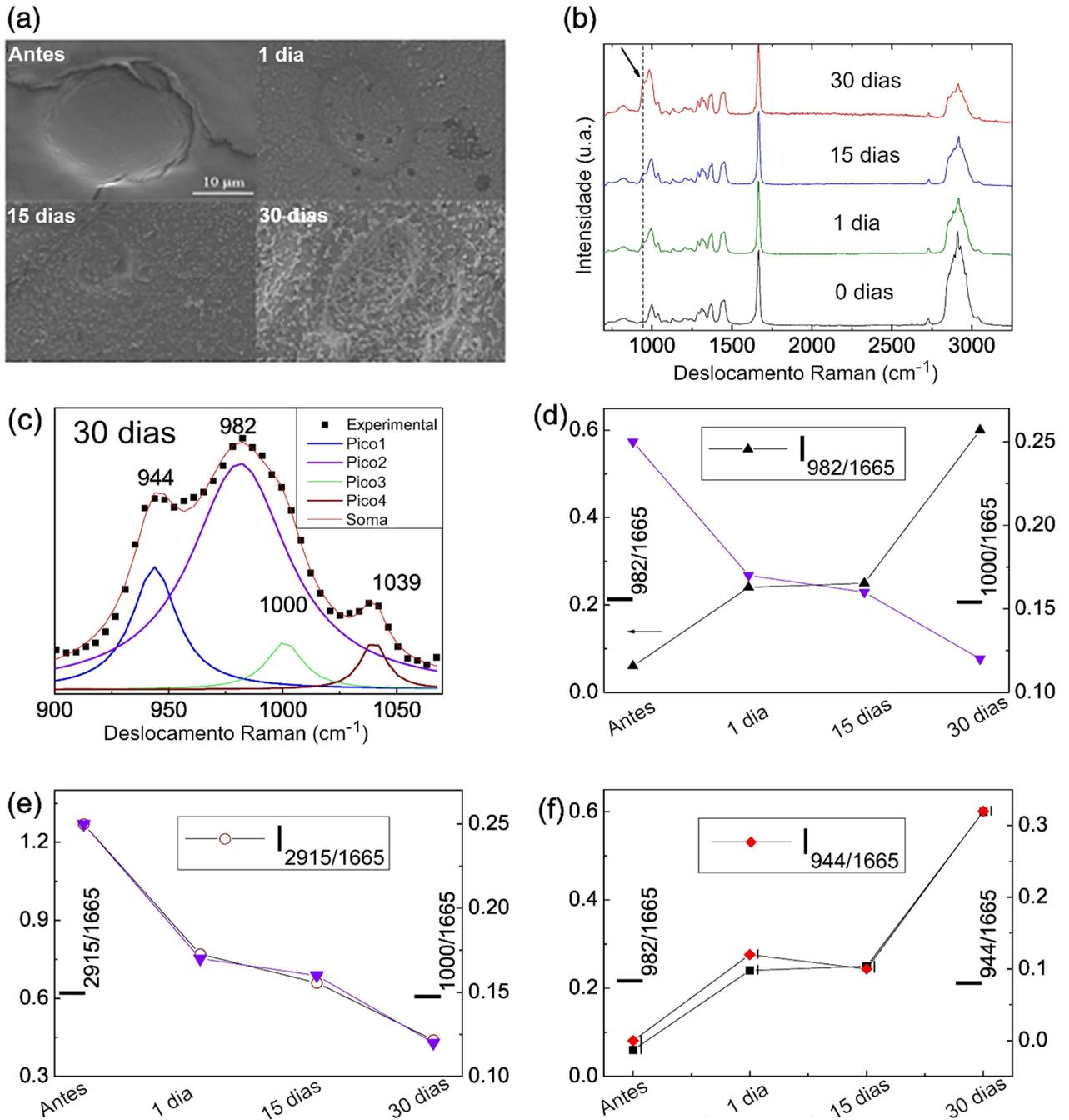
Fonte: Adaptado de DO NASCIMENTO et al. (2019, p. 421).

3.3.3 Características superficiais dos revestimentos de BN e BN-CaP em SBF

A Figura 13(a) apresenta as micrografias das amostras de revestimento antes e depois da imersão em SBF obtidas pela MEV, com diferentes tempos de exposição. Pode ser observado devido à orientação de crescimento, que se formaram partículas de sais provenientes do SBF nos revestimentos e, que o aumento da quantidade de partículas foi proporcional ao tempo de exposição. A Figura 13(b) revela os espectros Raman das amostras antes e depois de serem incubadas em SBF com diferentes períodos de tempo. Como observado, a BN preservou a sua estrutura química ao longo do tempo que esteve em contato com o fluido, ou seja, o revestimento resiste à alta força iônica proveniente do meio. Por outro

lado, uma nova banda apareceu nos espectros Raman na região de 900-1060 cm^{-1} , cuja intensidade aumenta em função do tempo de exposição.

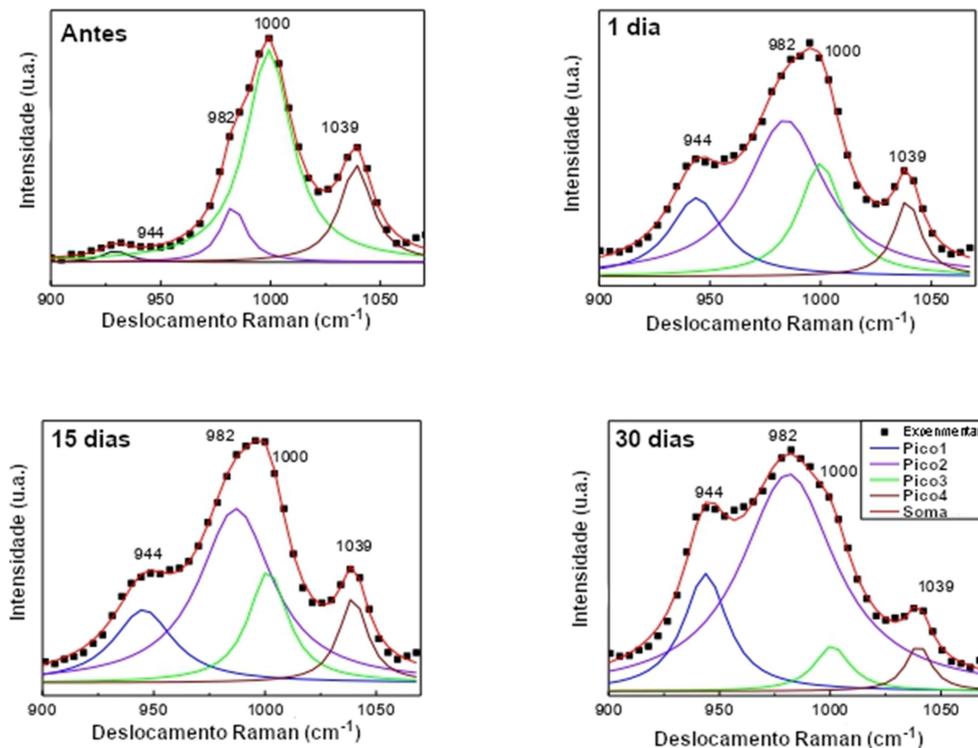
Figura 13 - (a) Imagens de MEV e (b) espectros Raman dos revestimentos de BN antes e depois da exposição ao SBF em diferentes tempos. (c) Análises em forma de linha dos espectros Raman e, (d - f) intensidades (I) normalizadas das regiões na faixa de 900-1060 cm^{-1} dos revestimentos de BN.



Fonte: Adaptado de DO NASCIMENTO et al. (2019, p. 422).

A Figura 13(c) exibe a decomposição Lorentziana dos espectros dos revestimentos de BN. O ombro em 944 cm^{-1} torna-se proeminente após interagir 30 dias com o SBF. Associa-se tal região com as vibrações internas da unidade de PO_4 e o pico é resultado da precipitação de sais no revestimento. Precisamente, atribui-se a banda no espectro Raman ao estiramento $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$, um dos quatro grupos dos modos normais do tetraedro regular de fosfato livre (STEFOV et al., 2004), que é uma característica de um CaP altamente desorganizado ou amorfo (CRANE et al., 2006). Além disso, a deconvolução do espectro revelou mudanças na região de 982 cm^{-1} atribuída ao estiramento P-O, indicando assim a presença de outras fases do CaP, tais como o fosfato dicálcico dihidratado (SAUER et al., 1994). Em adição, as mudanças na banda desta região podem induzir a formação de fosfato de potássio-magnésio hexahidratado (STEFOV et al., 2004) e/ou fosfato de magnésio tribásico $[\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2]$ (VOGEL; ADAM; MCNAUGHTON, 2013). Por meio da combinação das técnicas de espectroscopia vibracional e eletrônica, observou-se uma grande quantidade de Ca e Mg nas amostras de BN após os experimentos de imersão em SBF.

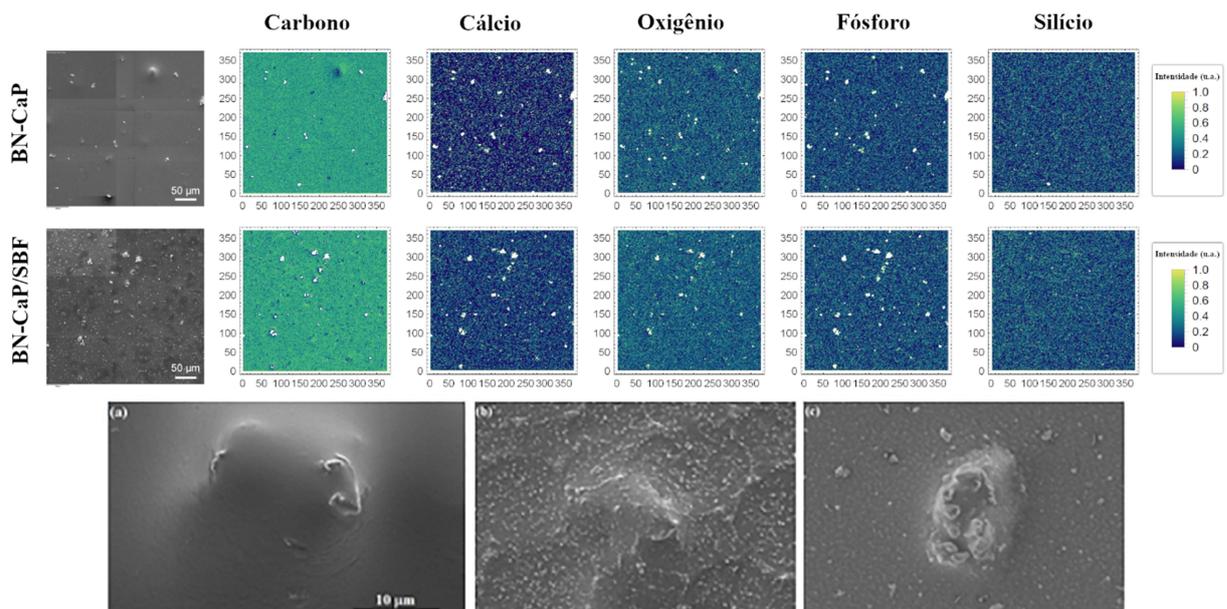
Figura 14 - Estudos de espalhamento: decomposições dos espectros Raman das bandas na região de $900\text{-}1060\text{ cm}^{-1}$ dos revestimentos de BN antes e depois de serem expostos ao SBF em diferentes períodos de exposição.



Fonte: Adaptado de DO NASCIMENTO et al. (2019).

É importante mencionar, que a inversão na intensidade dos principais picos Raman (2915 cm^{-1} e 1665 cm^{-1}) ocorre devido ao aumento no sinal do estiramento de C-H. Além disso, detectou-se a diminuição do percentual de carbono seguida pelo aumento do percentual de oxigênio após a interação das amostras com o SBF, como podem ser atestados pelas análises de EDS, os mapas químicos coloridos são fornecidos na Figura 15. As bandas na região de $900\text{-}1060\text{ cm}^{-1}$ foram normalizadas pela intensidade do sinal do pico de estiramento C=O do tipo balanço observadas em 1665 cm^{-1} , a fim de confirmar a ausência de independência de ambos, a potência do laser e a eficiência na coleta do sinal. Na Figura 14 estão apresentadas as decomposições dos espectros Raman das bandas mencionadas acima, para os revestimentos de BN antes e depois de serem expostos ao SBF em diferentes períodos de exposição. Foram encontradas modificações na estrutura PO_4 através da evolução das razões de intensidade $I_{\text{banda}}/I_{1665}$, ou seja, I_{2915}/I_{1665} , I_{1000}/I_{1665} e I_{944}/I_{1665} dentro do período de 30 dias, ver Figura 13(d-f). Este resultado confirma o aumento na quantidade de partículas devido à formação de minerais recém-depositados, especialmente o cálcio e fosfatos de magnésio que são bem conhecidos como materiais funcionais para regeneração tecidual. As imagens de MEV mostradas na Figura 15 confirmam a estabilidade dos revestimentos de BN-CaP antes e depois da exposição ao SBF durante 30 dias.

Figura 15 - Mapas químicos de EDS coloridos dos revestimentos de Si/BN-CaP antes e depois da exposição ao SBF. Imagens de MEV dos revestimentos de Si/BN-CaP com um CaP encapsulado obtido (a) antes da exposição, (b) 1 dia e (c) 30 dias após a exposição.

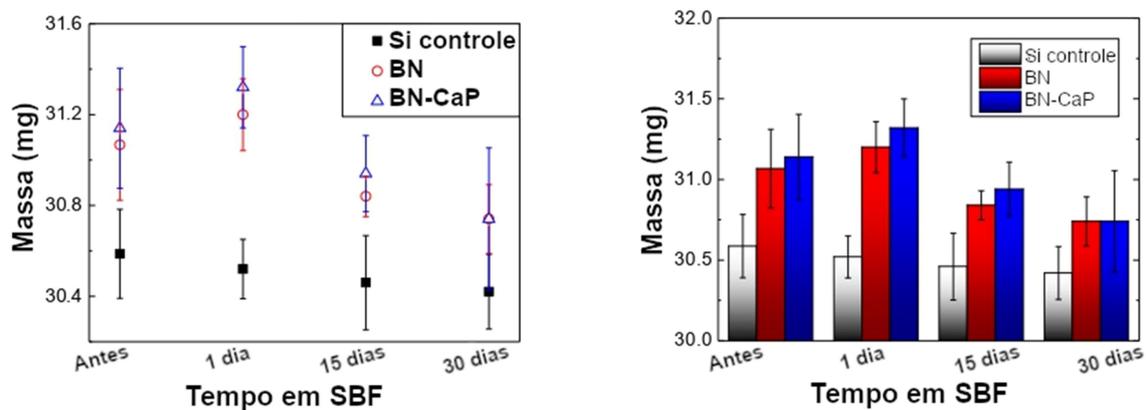


Fonte: Adaptado de DO NASCIMENTO et al. (2019, p. 423).

3.3.4 Biodegradabilidade dos revestimentos de BN em fluido corporal simulado

As análises estatísticas não revelaram diferença nos valores de massa dos revestimentos após 1 dia em SBF, ver Figura 16. Ambas as amostras Si/BN e Si/BN-CaP exibiram um comportamento de estabilidade físico-química semelhante no SBF em todos os tempos de incubação analisados. Por outro lado, os resultados das medidas das massas indicaram uma redução para os revestimentos incubados no fluido entre 1 e 15 dias, embora não tenha sido encontrada uma diferença significativa entre 15 e 30 dias. Levando em consideração a barra de erro para o substrato de silício (controle), os valores de massa aparentam ser constantes entre os períodos de 15 e 30 dias. Dois mecanismos possivelmente podem ser responsáveis por tal comportamento: (i) liberação de material do revestimento para o fluido e, (ii) deposição de material do fluido no revestimento. Para ambos, os valores de massa das amostras para diferentes períodos de tempo são mais comparáveis.

Figura 16 - Análises de biodegradabilidade: valores de massa dos revestimentos de BN antes e depois de serem expostos ao SBF em diferentes períodos.

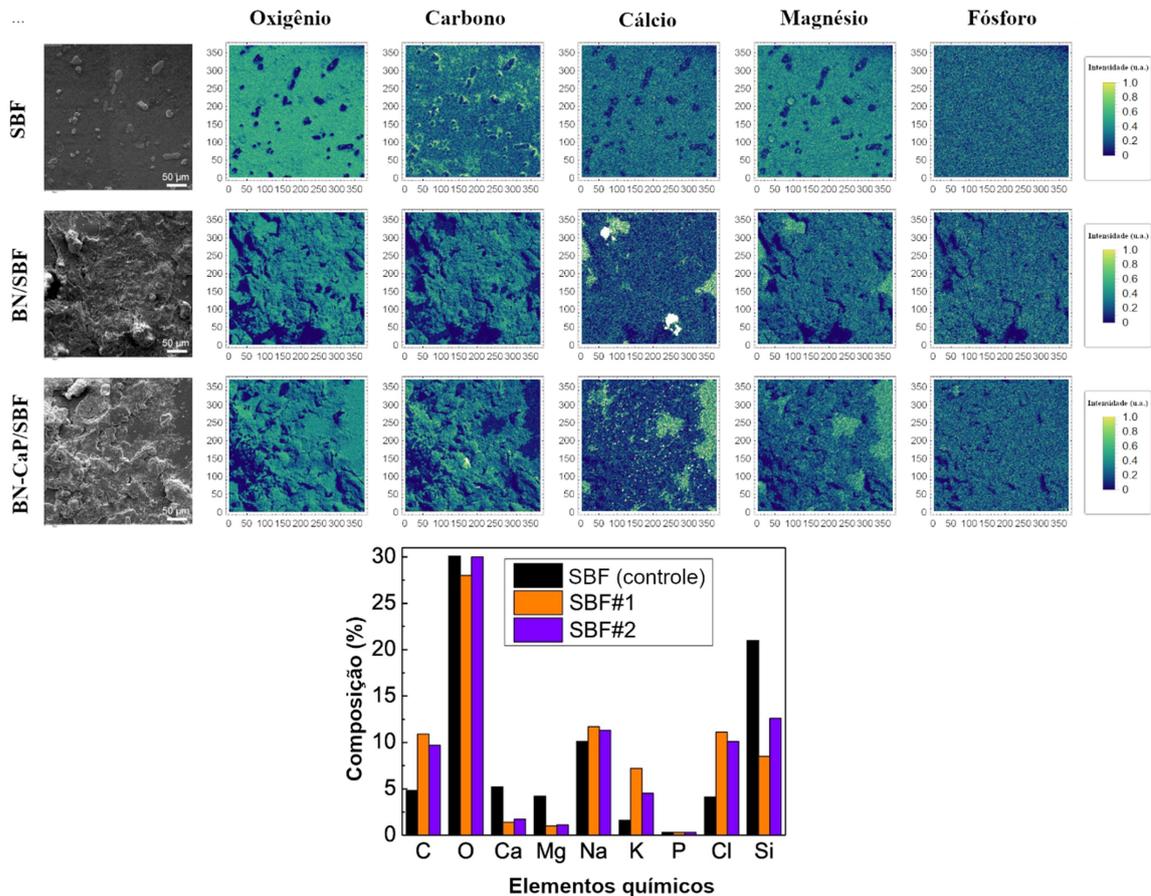


Fonte: Adaptado de DO NASCIMENTO et al. (2019).

Uma vez que, as modificações nos revestimentos estão sendo atribuídas à agregação de partículas originadas a partir do fluido, é relevante sondar seus efeitos no SBF. A Figura 17 mostra as micrografias de MEV com seus respectivos mapas químicos coloridos das seguintes amostras: (a) SBF_{Si} , (b) SBF_{Si-BN} e, (c) $SBF_{Si-BN/CaP}$ após 30 dias no meio. Para os experimentos, utilizou-se o meio de SBF final sem amostras de BN como controle para comparações entre as amostras. Encontrou-se uma diferença no percentual de carbono das amostras, 4,8% para SBF_{Si} , 10,9% para SBF_{Si-BN} e 9,7% para $SBF_{Si-BN/CaP}$. Tal fato está em

concordância com a diminuição no percentual de carbono observada nas amostras de BN após 30 dias expostas ao SBF (84,2 % para 72,4%).

Figura 17 - Micrografias de MEV, mapas químicos coloridos e composição química semi-quantitativa do (a) SBF_{Si}, (b) SBF_{Si/BN} e (c) SBF_{Si/BN-CaP} secos após os experimentos de 30 dias em imersão.



Fonte: Adaptado de DO NASCIMENTO et al. (2019, p. 424).

Esses resultados sugerem que os revestimentos exibem certo nível de biodegradabilidade, dada pela liberação de BN da camada superficial das amostras para o meio. Em contrapartida, não se observou nenhuma variação no percentual de P indicando assim que a formação de partículas de CaP nos revestimentos ocorre devido à interação eletrostática entre a camada superficial da BN carregada negativamente (~ -57 mV) e os íons Ca^{2+} . Os íons de cálcio depositados, por sua vez, interagem com os íons de fosfato (PO_4^{3-}) no SBF. Tais resultados sugerem que um dado nível das cargas superficiais negativas é responsável pela adsorção dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} do SBF. Essas cargas são originadas nas partículas não borracha do LBN.

Sendo assim, os componentes inorgânicos incorporaram-se aos revestimentos por ligações iônicas. O fluido biológico contém quantidades variadas de cátions e íons responsáveis pelas diferentes propriedades biológicas, tais como mineralização-regeneração de tecidos ósseos. Encontrou-se uma diminuição de Ca no SBF_{BN} durante a interação com o revestimento, ou seja, de 5,2% para 1,4% e 1,7%, para o SBF_{BN} e $\text{SBF}_{\text{BN/CaP}}$, respectivamente. Da mesma forma, detectou-se uma diminuição de Mg de 4,2% para 1,0% para o sistema de SBF_{BN} e de 1,1% para o $\text{SBF}_{\text{BN/CaP}}$. O processo de adsorção catiônica de uma superfície carregada negativamente explica as modificações superficiais dos revestimentos pelo ambiente biológico. Através da combinação das análises de espectroscopia vibracional-eletrônica conforme as seções 3.3.2 e 3.3.3, evidenciou-se que os revestimentos de BN-CaP apresentam tanto uma cinética de biomineralização quanto propriedades de biodegradabilidade.

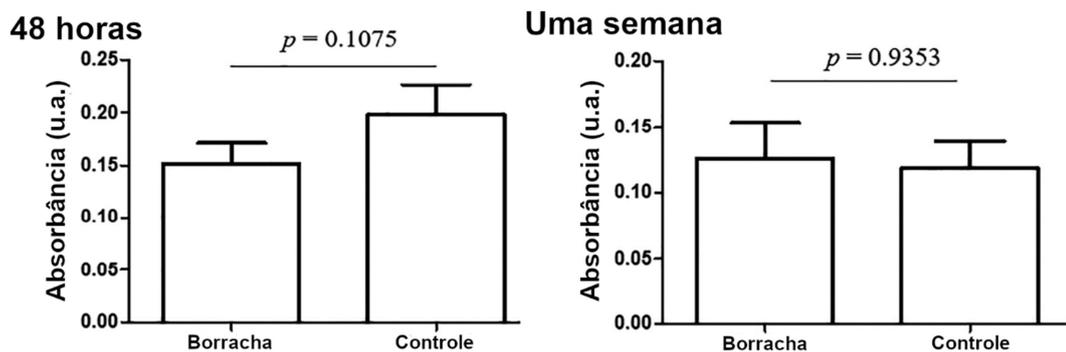
3.3.5 Viabilidade celular das superfícies de BN-CaP

O desempenho biocompatível dos materiais foi investigado através de análises quantitativas da resposta de células-tronco ao híbrido de BN. Os experimentos foram realizados pela unidade Biomateriais e Inflamação no Sítio Ósseo, Polo de Saúde, Faculdade de Odontologia da Universidade de Reims, França. Recentemente descrito pela equipe, o protocolo utilizado nos experimentos com as células-tronco gelatinosas de *Wharton* está de acordo com as habituais normas éticas legais (RAMMAL et al., 2017). A Figura 18 mostra as médias resultantes do crescimento das células-tronco nas superfícies. As análises estatísticas da viabilidade celular das amostras por *Mann-Whitney* não revelaram diferenças significativas entre as superfícies da BN e o grupo controle para um período de tempo de 48 h ($p = 0,1075$) e uma semana ($p = 0,9353$). O material exibiu 100% de viabilidade celular em comparação com o grupo controle após uma semana de análise.

Biomateriais à base de BN podem ter limitações de aplicação se eles não forem devidamente processados. Fatores como a quantidade de amônia e o método utilizado durante a coleta do látex das árvores podem afetar a resposta celular (FLORIANO et al., 2014). Os efeitos alergênicos são as complicações mais sérias na utilização do látex como biomateriais. A FDA estima que de 1 a 6% da população geral pode ser sensível ao LBN. Neste sentido, o látex é um meio biológico muito rico com mais de 200 tipos diferentes de proteínas, onde apenas 13 delas são alergênicas e podem ser prejudiciais à saúde. Portanto, para se aproveitar os benefícios desse polímero natural em Biomedicina, há duas possibilidades: 1) remover

partículas não borracha ou 2) inibir suas atividades. Em alguns experimentos anteriores, as proteínas foram removidas do látex pelo processo de centrifugação. Contudo, reportou-se uma diminuição da adesão e estabilidade dos filmes produzidos a partir dessa borracha natural.

Figura 18 - Média e desvio padrão da densidade ótica das culturas de células-tronco cultivadas na superfície do híbrido de BN e do controle da cultura celular cultivada na ausência de BN para o período de uma semana. Os resultados expressos possuem em média \pm SEM, $n = 12$, testes de Mann & Whitney.



Fonte: Adaptado de DO NASCIMENTO et al. (2019, p. 424).

Sendo assim, propôs-se aqui um híbrido de BN incorporado com partículas de CaP, com o intuito de reduzir os efeitos da carga negativa da superfície do híbrido ao invés de se remover as proteínas, uma vez que a remoção das proteínas resulta em limitações nas propriedades mecânicas e superficiais da BN. A inibição da atividade das proteínas pode ser considerada a vanguarda das opções para a diminuição dos efeitos indesejáveis do látex, como o tratamento da BN com tanino vegetal (PATERNO et al., 2017), onde os pesquisadores têm desenvolvido uma forma de inativar as proteínas alergênicas no LBN através da utilização do tanino como um revestimento de superfície.

Como proposto neste trabalho, o processo de hibridização do polímero de BN diminui as cargas negativas provenientes das proteínas de -57 mV para -15 mV, como atestado pelas medidas de potencial zeta. A carga resultante do híbrido de BN é levemente inferior a carga de uma membrana celular, que consistem em bicamadas de fosfolípidios com carga de aproximadamente -20 mV. Como demonstrado por DANNA et al., 2017, moléculas levemente carregadas negativamente mostram um menor efeito desfavorável na resposta celular (DANNA et al., 2017). Portanto, atribui-se aqui a boa viabilidade celular do híbrido BN-CaP à diminuição dos efeitos de carga das proteínas sobre as superfícies da BN.

3.4 Conclusão

Neste trabalho, estudou-se a produção de revestimentos híbridos de BN-CaP com foco particular nas características morfológicas e estruturais, na estabilidade físico-química em fluido corporal simulado e também na atividade do revestimento na formação/precipitação de Mg e CaP a partir do meio de incubação. Os resultados indicaram que a concentração de amônia e as velocidades de centrifugação (2000g, 6000g, 10000g e 14000g) têm pequena influência na estrutura química da fase creme da BN extraída, como avaliado pelas técnicas de espectroscopia vibracional (FTIR e Raman). O encapsulamento do CaP pela BN foi atribuído principalmente as interações eletrostáticas entre as biomoléculas carregadas negativamente presentes na borracha e as partículas de CaP carregadas positivamente. A interação entre os híbridos BN-CaP e o fluido corporal simulado também foi estudada, objetivando acessar propriedades desejáveis a exploração de aplicações como revestimentos bioativos. As superfícies dos revestimentos foram modificadas físico-quimicamente durante 30 dias em contato com o SBF. A formação de partículas de CaP sobre os revestimentos de BN ocorre devido às interações eletrostáticas entre a camada da superfície de BN carregada negativamente (- 57 mV) e os íons de Ca^{2+} , induzindo assim a nucleação de sais à base de Ca, especialmente com íons de fosfato (PO_4^{3-}). Logo, as apatitas cresceram espontaneamente acompanhadas pelo consumo de íons de Ca e P. Íons variados, ou seja, Ca^{2+} , CaOH^+ , PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} e $\text{CaH}_2\text{PO}_4^+$ na superfície dos revestimentos possibilitam a adsorção de proteínas e de alguns produtos químicos no corpo humano. Além disso, o revestimento híbrido de BN-CaP formado no substrato de Si exibiu biocompatibilidade, estabilidade e biodegradabilidade em diferentes níveis (dependência temporal). Tais propriedades, portanto, abrem novos horizontes para aplicações desse híbrido como biomateriais para implantes, *scaffolds* e sistemas de liberação controlada de drogas.

Referências

ABRAHAM, E. et al. X-ray diffraction and biodegradation analysis of green composites of natural rubber/nanocellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, n. 11, p. 2378–2387, nov. 2012.

ARAÚJO, M. M.; MASSUDA, E. T.; HYPOLITO, M. A. Anatomical and functional evaluation of tympanoplasty using a transitory natural latex biomembrane implant from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 8, p. 566–571, ago. 2012.

- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1767, n. 9, p. 1073–1101, 2007.
- BERTHELOT, K. et al. Rubber particle proteins, HbREF and HbSRPP, show different interactions with model membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1838, n. 1, p. 287–299, jan. 2014.
- BORGES, F. A. et al. Natural rubber latex coated with calcium phosphate for biomedical application. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 26, n. 17, p. 1256–1268, 22 nov. 2015.
- BORGES, F. A. et al. Application of natural rubber latex as scaffold for osteoblast to guided bone regeneration. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 39, p. 1–10, 15 out. 2017.
- CRANE, N. J. et al. Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization. **Bone**, v. 39, n. 3, p. 434–442, 2006.
- DANNA, C. S. et al. Flexible fluorescent films based on quantum dots (QDs) and natural rubber. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 43, p. 2–11, 2017.
- DANNA, C. S. C. S. et al. Silver Nanoparticles Embedded in Natural Rubber Films: Synthesis, Characterization, and Evaluation of in Vitro Toxicity. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, p. 1–10, 2016.
- DICK, T. A.; DOS SANTOS, L. A. In situ synthesis and characterization of hydroxyapatite/natural rubber composites for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 874–882, 2017.
- DO NASCIMENTO, R. M. et al. Effects of negatively and positively charged Ti metal surfaces on ceramic coating adhesion and cell response. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 28, n. 2, p. 33, 20 fev. 2017.
- DO NASCIMENTO, R. M. et al. Towards the production of natural rubber-calcium phosphate hybrid for applications as bioactive coatings. **Materials Science and Engineering C**, v. 94, n. September 2018, p. 417–425, 2019.
- ERENO, C. et al. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 95A, n. 3, p. 932–939, 1 dez. 2010.
- FERREIRA, M. et al. Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, n. 3, p. 564–569, set. 2009.
- FLORIANO, J. F. et al. Biocompatibility studies of natural rubber latex from different tree clones and collection methods. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 2, p. 461–470, 8 fev. 2014.
- GABER, B. P.; PETICOLAS, W. L. On the quantitative interpretation of biomembrane structure by Raman spectroscopy. **BBA - Biomembranes**, v. 465, n. 2, p. 260–274, 1977.

HERCULANO, R. D. et al. On the release of metronidazole from natural rubber latex membranes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 2, p. 272–275, mar. 2011.

LHERT, F. et al. Raman Spectroscopy of Phospholipid Black Films. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 49, p. 11704–11707, 2000.

LU, F. J.; HSU, S. L. **Vibrational Spectroscopic Analysis of the Structure of Natural Rubber**. **Rubber Chemistry and Technology**, 1987.

MOURA, J. M. L. et al. Comparison of the performance of natural latex membranes prepared with different procedures and PTFE membrane in guided bone regeneration (GBR) in rabbits. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 9, p. 2111–2120, 22 set. 2014.

NASCIMENTO, R. M. et al. Production and characterization of natural rubber-Ca/P blends for biomedical purposes. **Materials Science and Engineering C**, v. 39, n. 1, p. 29–34, 2014.

NAWAMAWAT, K. et al. Surface nanostructure of Hevea brasiliensis natural rubber latex particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 390, n. 1–3, p. 157–166, out. 2011.

PATERNIO, L. G. et al. **Tratamento do Látex de Borracha Natural com Tanino Vegetal** Brazil, 2017. Disponível em:
http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/24470/1/2017_FlorianoPastoreJunior.pdf

PICHAYAKORN, W. et al. Deproteinised natural rubber used as a controlling layer membrane in reservoir-type nicotine transdermal patches. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 91, n. 3, p. 520–529, mar. 2013.

RAMMAL, H. et al. Bioinspired Nanofeatured Substrates: Suitable Environment for Bone Regeneration. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 14, p. 12791–12801, 2017.

RIPPEL, M. M. et al. Formation of calcium crystallites in dry natural rubber particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 288, n. 2, p. 449–456, 2005.

ROLERE, S. et al. Investigating natural rubber composition with Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid and non-destructive method to determine both protein and lipid contents simultaneously. **Polymer Testing**, v. 43, p. 83–93, 2015.

RYGULA, A. et al. Raman spectroscopy of proteins: A review. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 44, n. 8, p. 1061–1076, 2013.

SANTIPANUSOPON, S.; RIYAJAN, S.-A. Effect of field natural rubber latex with different ammonia contents and storage period on physical properties of latex concentrate, stability of skim latex and dipped film. **Physics Procedia**, v. 2, n. 1, p. 127–134, jul. 2009.

SAUER, G. R. et al. Fourier transform raman spectroscopy of synthetic and biological calcium phosphates. **Calcified Tissue International**, v. 54, n. 5, p. 414–420, 1994.

SIMOES, R. D. et al. Structural characterization of blends containing both PVDF and natural

- rubber latex. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 36, n. 12, p. 1118–1124, 2005.
- SNYDER, R. G.; HSU, S. L.; KRIMM, S. Vibrational spectra in the CH stretching region and the structure of the polymethylene chain. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 34, n. 4, p. 395–406, 1978.
- STEFOV, V. et al. Infrared and Raman spectra of magnesium ammonium phosphate hexahydrate (struvite) and its isomorphous analogues. I. Spectra of protiated and partially deuterated magnesium potassium phosphate hexahydrate. **Journal of Molecular Structure**, v. 689, n. 1–2, p. 1–10, 2004.
- THEPCHALERM, C. et al. The stability of lutoids in hevea brasiliensis latex influences the storage hardening of natural rubber. **Journal of Rubber Research**, v. 18, n. 1, p. 17–26, 2015.
- VOGEL, C.; ADAM, C.; MCNAUGHTON, D. Determination of phosphate phases in sewage sludge ash-based fertilizers by Raman microspectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 67, n. 9, p. 1101–1105, 2013.
- WISUTIRATANAMANEE, A.; POOCHINDA, K.; POOMPRADUB, S. Low-temperature particle synthesis of titania/silica/natural rubber composites for antibacterial properties. **Advanced Powder Technology**, v. 28, n. 4, p. 1263–1269, 2017.
- YU, P. et al. A comprehensive study on lignin as a green alternative of silica in natural rubber composites. **Polymer Testing**, v. 54, p. 176–185, 2016.
- ZHAN, Y.; MENG, Y.; LI, Y. Electric heating behavior of flexible graphene/natural rubber conductor with self-healing conductive network. *Materials Letters*, v. 192, p. 115–118, abr. 2017.

4 ESTUDO *IN SITU* DA ESTABILIDADE MORFOLÓGICA DE FILMES DE BORRACHA NATURAL UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA FLUORESCENTES COMO SONDAS

4.1 Introdução

O látex de borracha natural obtido da árvore *Hevea brasiliensis* é um sistema de partículas coloidais polidispersas suspensas em um soro, contendo partículas de borracha natural e componentes não borracha, tais como proteínas, fosfolipídios e lutoídeos. A borracha natural (BN) é um importante biopolímero renovável considerado como um material estratégico devido algumas de suas aplicações únicas, cuja substituição pela borracha sintética na indústria manufatureira não é praticável (VAN BEILEN; POIRIER, 2007). O sistema BN é alvo atual de muitos estudos que abrangem desde a área automotiva (AZAMMI et al., 2018; SHAHRIL; AZAMMI; ZULFADLI, 2017) a biomédica (CESAR et al., 2020; MEDUPIN et al., 2019). Os aspectos biocompatíveis da BN (FLORIANO et al., 2014) vêm abrindo novos horizontes, por exemplo, à sua utilização em terapias regenerativas (KINOSHITA et al., 2019). Na engenharia microeletrônica, o sistema BN exibe um potencial notável como uma alternativa natural para semicondutores orgânicos atuais (THAPPILY; MANDIN; SAUVAGE, 2020). Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de viabilizar aplicações da BN como tecnologias inovadoras e de alto valor agregado na área de compósitos (GUO et al., 2020; NAKANISHI et al., 2019; OGUNSONA; MISRA; MOHANTY, 2017; SUKHAWIPAT et al., 2020; SUTTEEWONG et al., 2019; YONG; ANG; SARIH, 2019). Além disso, quando combinadas com diferentes materiais, novas propriedades, como eletromecânica (GAO; HE; GONG, 2018; NIAMLANG et al., 2017), condutividade térmica (GEORGE et al., 2017) e retardante de chama (CHEN; QIU, 2020; ZHANG; WANG, 2018), são a base para a introdução da BN em sistemas compósitos com a finalidade de desenvolver produtos com características superiores.

Do ponto de vista de caracterizações, matrizes poliméricas incorporadas com diferentes materiais são usualmente avaliadas por técnicas de microscopia eletrônica, a qual fornece apenas informações parciais da estrutura interna dos compósitos. Além disso, as amostras em análise podem ser submetidas a certos protocolos de preparação, como técnicas de secagem a vácuo, corte, craqueamento e/ou pulverização de metais, que acarretam em modificações das mesmas. Nesse sentido, a necessidade de se estabelecer novas abordagens que tornem possível a visualização *in situ* de características morfológicas de compósitos à

base de BN com preenchimento sem que haja qualquer modificação das amostras, é de grande interesse para os mais variados campos e o principal objetivo deste estudo. Por outro lado, para as aplicações mencionadas acima, a avaliação e o controle da estabilidade de compósitos de BN em diferentes cenários também são de fundamental importância, incluindo o uso de metodologias adequadas que forneçam informações sobre a resistência dos mesmos sob condições de fluxo em meios de alta força iônica. Adicionalmente, até o momento, ainda não há na literatura uma abordagem rigorosa que permita monitorar a estabilidade morfológica de compósitos poliméricos submetidos à tensão de cisalhamento de fluidos, sem mencionar que o monitoramento de tal comportamento exige a utilização de uma sonda apropriada.

Por sua vez, a sílica (SiO_2) tem sido amplamente aplicada como matriz no encapsulamento de outros materiais numa estratégia de *core-shell* (arquitetura núcleo-casca), como em nanopartículas de prata, pesticidas, magnetita e corantes (DING et al., 2012). A camada de SiO_2 atua na proteção dos componentes do núcleo de um possível processo de oxidação ocasionado pelo meio externo e ainda torna a dispersão coloidal mais estável (BURNS; OW; WIESNER, 2006; JEELANI et al., 2019; OW et al., 2005). Partículas de SiO_2 (SiPs) têm sido muito utilizadas em sistemas compósitos, principalmente devido suas características, como estabilidade térmica, não-reatividade, facilidade de modificação da sua superfície com outros grupos funcionais (DE OLIVEIRA et al., 2016), interações moleculares favoráveis com outros sistemas (PAULA et al., 2012) e biocompatibilidade (CAPELETTI et al., 2014). As SiPs representam uma plataforma versátil com processos de síntese e amina-funcionalização bem estabilizados, que permitem gerar partículas de diferentes tamanhos e composições químicas superficiais (ARGYO et al., 2014). Em particular, as SiPs têm sido muito empregadas como preenchimento em sistemas compósitos à base de BN, seja como um material de reforço para melhorar as propriedades mecânicas da BN (CHAN et al., 2015; PRASERTSRI; RATTANASOM, 2011; XU et al., 2015) ou suas propriedades térmicas (ON et al., 2012; PRASERTSRI et al., 2013). Aqui, produziu-se SiPs *core-shell* fluorescentes para serem usadas como sondas na investigação da morfologia e da estrutura de sistemas compósitos baseados em BN, bem como sua estabilidade morfológica muda com o tempo e sob um sistema de fluxo líquido.

O trabalho descrito neste capítulo reporta o desenvolvimento de compósitos de BN incorporados com SiPs fluorescentes monodispersas, bem como uma estratégia única de caracterização da estabilidade morfológica dos mesmos. As interações BN-SiPs são compreendidas aqui por meio das principais características relacionados à sonda (tamanho, concentração e funcionalidade de sua superfície) e a matriz polimérica (solvente orgânico).

Foram geradas SiPs fluorescentes com dois tamanhos distintos (150 e 700 nm) e com concentrações e cargas superficiais distintas, cujos sinais de fluorescência foram medidos através da microscopia confocal de varredura a laser. Dois diferentes tipos de filmes compósitos de BN-SiPs foram produzidos considerando as características físico-químicas dos solventes utilizados no processo de dissolução da BN. A microscopia Raman confocal revelou a habilidade da matriz de BN em incorporar SiPs carregadas, além de desvendar que os componentes do sistema BN-SiPs se organizam quanto à estrutura química e automontagem. Os filmes compósitos foram submetidos à tensão de cisalhamento de fluidos, para avaliar suas respostas sob condições de fluxo, em água e em solução salina, sendo o monitoramento realizado pela microscopia confocal de varredura a laser. A solução salina foi introduzida nos experimentos devido a sua alta força iônica, portanto, um ambiente propício à degradação de materiais. A abordagem de imageamento *in situ* empregada aqui permitiu observar a elevada estabilidade morfológica apresentada pelos filmes compósitos, além do papel das SiPs como sondas. Sendo os resultados discutidos neste trabalho em termos dos aspectos morfológicos e estruturais dos filmes compósitos de BN-SiPs.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Materiais

Os processos de síntese e amino-funcionalização das SiPs fluorescentes realizados utilizaram os seguintes materiais: ortossilicato de tetraetila (TEOS, 98%, *Sigma-Aldrich*), (3-aminopropil)trimetoxissilano (APTMS, 97%, *Sigma-Aldrich*), isotiocianato de fluoresceína (FITC, 97.5%, *Sigma-Aldrich*), solução de amônia (NH₄OH, 28–30%, Vetec), etanol absoluto (EtOH, 99.5%, Dinâmica) e água ultrapura. O látex de BN foi coletado a partir de árvores de *Hevea brasiliensis* (clone RRIM 600) localizadas na fazenda Estância Regina, no Estado de São Paulo, Brasil (20°33'21.03''S 48°61'13.49''W). Após coletado, estabilizou-se o látex (fresco) através da adição de solução de amônia (NH₄OH, 28–30%, Dinâmica) com uma concentração final de 0,9% m/m. O látex de BN com elevada concentração de amônia estabiliza suas partículas de BN devido à adsorção de ácidos graxos de cadeia longa produzidos pela hidrólise de fosfolipídios e alguns polipeptídios (de proteínas hidrolisadas) (RIYAJAN; SANTIPANUSOPON, 2010). A formação de tais estruturais ao redor das partículas previne seu processo de coagulação espontânea. A elevada quantidade de amônia adicionada acarreta em um aumento do pH do látex, evitando também uma atividade

bacteriana no mesmo (HO et al., 1996). As amostras de látex estabilizadas foram mantidas sob refrigeração a 4 °C até seu uso posteriormente.

4.2.2 Síntese das SiPs fluorescentes core-shell

As dispersões coloidais das SiPs fluorescentes monodispersas utilizadas neste trabalho foram preparadas baseadas no método de Stöber modificado (SONG et al., 2011; STÖBER; FINK; BOHN, 1968). Os tamanhos das partículas foram ajustados utilizando-se quantidades diferenciadas de TEOS, amônia e etanol, resultando em SiPs com diâmetros médios de aproximadamente 150 nm (SiP1) e 700 nm (SiP2), nomeados aqui como protocolo de síntese 1 e 2, respectivamente; esses desenvolvidos em duas etapas. A primeira etapa foi realizada na obtenção das SiPs de ambos os tamanhos. Ela consiste na fixação covalente da molécula de corante (FITC) ao agente de acoplamento silano (APTMS) pela reação dos grupos amina do APTMS com o grupo isotocianato do corante. Para isso, dissolveram-se 3,0 mg de FITC em 3 mL de etanol absoluto, e 3,2 µL de APTMS também foram adicionados à solução. Em seguida, a mistura foi suavemente homogeneizada e deixada para reagir no escuro pelo período de 1h a temperatura ambiente. Na segunda etapa, para a síntese 1, adicionou-se 7 mL de etanol absoluto, 800 µL de TEOS e 800 µL de hidróxido de amônia à solução FITC-APTMS. Já para a síntese 2, foram adicionados 1,5 mL de etanol absoluto, 800 µL de TEOS e 6,3 mL de hidróxido de amônia, nesta ordem. Em seguida, cada reação foi mantida sob agitação constante a temperatura de 60 ± 4 °C por 2h. Ao final do período, as suspensões foram centrifugadas a 48,200 rcf, a 4 °C por 30 min para interromper o crescimento das partículas e remover o excesso de reagentes. Ao final da centrifugação, descartou-se o supernadante das reações e as partículas foram ressuspensas em etanol absoluto em um banho ultrassônico (Cole-Parmer, IL, USA). O ciclo de centrifugação/ressuspensão foi repetido por três vezes para cada síntese, para assegurar uma remoção completa dos resíduos da reação. Por fim, as SiPs foram armazenadas em etanol absoluto e mantidas sob refrigeração a 4 °C.

4.2.3 Funcionalização superficial das SiPs fluorescentes core-shell

As SiPs foram amino-funcionalizadas utilizando um método de pós-enxerto baseado no trabalho de LU (2013), conferindo uma carga positiva à superfície das partículas. Para a funcionalização das SiP1, adicionou-se vagarosamente à 12 mL de suspensão de SiPs

(concentração de 20 mg/mL) uma mistura contendo 28 μL de APTMS, 10 μL de hidróxido de amônia e 100 μL de água ultrapura sob agitação vigorosa. Em seguida, a solução resultante foi agitada e refluxada a 75 ± 4 °C por 3h para propiciar a ligação covalente do APTMS à superfície da partícula. Ao final, submeteu-se a suspensão funcionalizada a três ciclos de centrifugação/ressuspensão para remover os resíduos da reação. Os mesmos passos foram aplicados à funcionalização da suspensão das SiP2, exceto pela quantidade de hidróxido de amônia adicionada (63 μL). A análise termogravimétrica foi utilizada para determinar os conteúdos sólidos de todas as suspensões de SiPs. As SiPs amino-funcionalizadas (ASiPs) foram nomeadas aqui como ASiP1 (SiPs de 150 nm amino-funcionalizadas) e ASiP2 (SiPs de 700 nm amino-funcionalizadas).

4.2.4 Preparação das suspensões de BN

O látex de BN foi submetido ao processo de centrifugação com uma velocidade de 14000 rcf por 90 min, a temperatura de 24 °C. Como relatado previamente por DO NASCIMENTO et al. (2019), este processo permite a separação de suas fases. No presente estudo, utilizou-se a fase creme na produção das suspensões de BN, pois ela concentra a porção mais significativa de partículas de BN. A fase creme foi seca por 24 h a 45 °C, e logo após dissolvida em clorofórmio e em tolueno por 72 h para produzir suspensões de BN com concentrações finais de 10 mg/mL.

4.2.5 Produção dos filmes compósitos de BN-SiPs

As SiPs foram sonicadas para evitar qualquer aglomeração e, em seguida, misturadas às suspensões de BN com concentrações finais de 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL. Subsequentemente, gotejou-se cuidadosamente um volume de 40 μL das suspensões BN-SiPs em lamínulas de vidro, que foram previamente limpas em banho ultrassônico com detergente, água ultrapura e etanol absoluto pelo período de 10 min em cada solvente. No total foram produzidas dezesseis (16) amostras, sendo estas classificadas conforme os seguintes parâmetros: tipo de solvente utilizado nas suspensões de BN (clorofórmio e tolueno), concentração, tamanho e potencial zeta das SiPs, ver Tabela 7.

Tabela 7 - Descrição das amostras estudadas neste trabalho. Elas foram classificadas conforme os parâmetros utilizados na produção dos filmes compósitos de BN-SiPs (tipo de solvente utilizado nas suspensões de BN, concentração, tamanho e potencial zeta das SiPs).

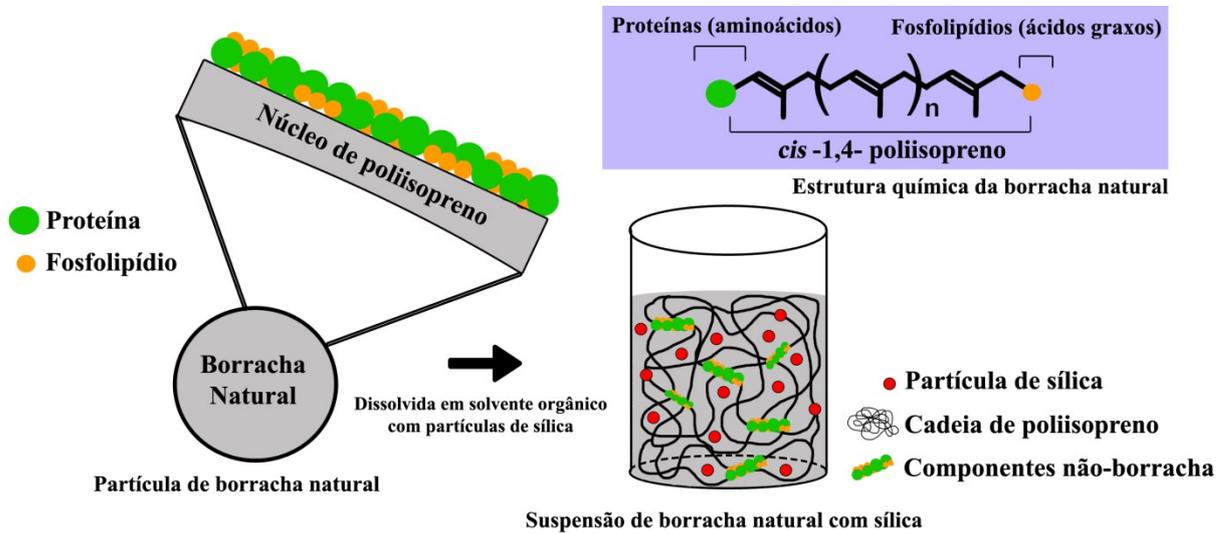
Nome da Amostra	Suspensão de BN		Suspensões de SiPs	
	Solvente Orgânico	Concentração (mg/mL)	Tam. das Partículas (nm)	Potencial Zeta (mV)*
CLF01-SiP1	Clorofórmio	0.1	150	- 50.9
CLF01-ASi1P	Clorofórmio	0.1	150	+ 39.9
CLF01-SiP2	Clorofórmio	0.1	700	- 50.1
CLF01-ASi2P	Clorofórmio	0.1	700	+ 54.1
CLF005-SiP1	Clorofórmio	0.05	150	- 50.9
CLF005-ASiP1	Clorofórmio	0.05	150	+ 39.9
CLF005-SiP2	Clorofórmio	0.05	700	- 50.1
CLF005-ASiP2	Clorofórmio	0.05	700	+ 54.1
TOL01-SiP1	Tolueno	0.1	150	- 50.9
TOL01-ASiP1	Tolueno	0.1	150	+ 39.9
TOL01-SiP2	Tolueno	0.1	700	- 50.1
TOL01-ASiP2	Tolueno	0.1	700	+ 54.1
TOL005-SiP1	Tolueno	0.05	150	- 50.9
TOL005-ASiP1	Tolueno	0.05	150	+ 39.9
TOL005-SiP2	Tolueno	0.05	700	- 50.1
TOL005-ASiP2	Tolueno	0.05	700	+ 54.1

* Os valores do potencial zeta fornecidos foram determinados em meio aquoso.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os componentes do sistema BN são fatores determinantes em relação à produção dos filmes compósitos de BN-SiPs. Em geral, as partículas de BN, com diâmetro numa faixa de tamanho de aproximadamente 50 nm a 2 µm, exibem uma arquitetura *core-shell* com moléculas de poliisopreno como núcleo (94% em massa) rodeado por uma fina camada composta por componentes não borracha como casca (6% em massa), que inclui proteínas, fosfolipídios, polipeptídios ou ácidos graxos de cadeia longa (ROCHETTE et al., 2013). A estrutura química da BN é formada pela cadeia de borracha conectada a dois grupos funcionais em ambos os terminais inicial e final, sendo o primeiro ligado a proteínas, enquanto o último a fosfolipídios (TARACHIWIN et al., 2005). Como será discutido posteriormente, a polaridade e a solubilidade do sistema BN possuem uma relação direta com a formação final dos filmes compósitos de BN-SiPs, ver Figura 19.

Figura 19 – Ilustração esquemática dos principais componentes do sistema BN utilizado neste estudo. A partícula de BN, arquitetura *core-shell*, consiste de um núcleo formado a partir de moléculas de poliisopreno rodeado por uma fina camada composta por componentes não borracha como casa; a estrutura química da BN é formada por uma cadeia de borracha conectada a dois grupos funcionais (proteínas e fosfolipídios); e a produção das suspensões de BN-SiPs (as escalas de tamanho não equivalem ao tamanho real).



Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.6 Caracterização das partículas de sílica fluorescentes

A distribuição de tamanho, o índice de polidispersividade (PDI, do inglês *polydispersity index*) e o potencial zeta das SiPs foram obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês *dynamic light scattering*) em um Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK), para isso as SiPs foram dispersadas em água ultrapura. As suspensões de SiPs foram centrifugadas a 16000 rcf por 40 min a 4 °C. O sobrenadante (etanol absoluto) foi descartado e as partículas resuspensas utilizando água ultrapura como meio dispersante. A concentração final das SiPs utilizada nas medidas de DLS foi de 200 µg/mL. Antes de cada medida, as suspensões foram sonicadas por 5 min em um banho ultrassônico para prevenir qualquer aglomeração. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das SiPs fluorescentes foram obtidas utilizando-se um microscópio Hitachi® HT7700 com uma tensão de aceleração de 120 kV. Para adquirir as micrografias, as SiPs secas foram primeiramente dispersadas em etanol e depois depositadas num suporte de amostra, uma grade de cobre revestida com carbono.

4.2.7 Caracterização microscópica e espectroscópica dos filmes compósitos de BN-SiPs

A morfologia dos filmes compósitos de BN-SiPs e a distribuição das SiPs na matriz polimérica foram analisadas pela microscopia confocal de varredura a laser (CLSM, do inglês *confocal laser scanning microscopy*) em um microscópio confocal Zeiss LSM 710 (Zeiss, Munich, Germany). As amostras foram imageadas utilizando-se uma lente objetiva Zeiss EC Plan-Neofluor 100 x (NA = 1,3, distância de trabalho = 0,20 mm, imersão em óleo). Foram usados diferentes comprimentos de onda para adquirir as informações dos múltiplos componentes da amostra. Utilizou-se um laser de 405 nm para mapear os componentes da BN. E para avaliar a localização das SiPs fluorescentes, utilizou-se um laser de 488 nm a fim de excitar as moléculas de FITC no núcleo das partículas. As pilhas de imagens de fluorescência foram registradas com uma seção ótica de 0,5 μm .

A estrutura e a composição química dos componentes dos filmes compósitos de BN-SiPs foram investigadas pela espectroscopia confocal Raman por meio do mapeamento Raman. As análises foram realizadas em um microscópio WITec alpha 300 equipado com um estágio piezoelétrico altamente linear (0,02%) e uma lente objetiva Nikon (100x, NA = 0,90). Para adquirir os espectros Raman, os filmes foram iluminados com um laser Nd:YAG ($\lambda=532$ nm, 2,33 eV). Uma CCD espectroscópica retroiluminada de alta sensibilidade detectou a luz Raman, após ela ser dispersa por um sistema de grade de 600 g/mm. Aplicou-se uma potência de 550 μW no final da lente objetiva para focar as amostras. Aqui, foi utilizado um espectrômetro WITec UHTS 300 de ultra-alto-rendimento, especificamente projetado para ser utilizado na microscopia Raman, com até 70% de rendimento. O tempo de integração foi de 0,5 s/pixel e as áreas medidas de $30 \times 30 \mu\text{m}$ com 90 pixels em cada direção.

4.2.8 Caracterização da molhabilidade de superfície dos filmes compósitos de BN-SiPs

Para avaliar os regimes de molhabilidade das amostras de filmes compósitos de BN-SiPs foram realizadas medidas de ângulo de contato estático de gotas de água ultrapura (volume de $\sim 2 \mu\text{L}$), através do método de gota séssil padrão em um tensiômetro/goniômetro 250-F1, Ramé-Hart. Para cada experimento, uma gota de água foi suavemente depositada para cada superfície em uma câmara fechada. Um sistema de luz branca e homogênea foi posicionado atrás da amostra a fim de fazer a gota aparecer preta. Imagens da vista lateral das gotas foram gravadas com uma câmera CCD para a caracterização subsequente dos regimes de molhabilidade das superfícies. No início dos experimentos, a temperatura ambiente da

amostra foi configurada em 22 ± 2 °C e a umidade relativa em $48 \pm 6\%$. A energia de superfície foi calculada com base nos valores dos ângulos de contato obtidos em líquidos com diferentes polaridades. A teoria por trás dessa abordagem é baseada no conceito de interações intermoleculares de curto e longo alcance, denominadas interações polar e dispersiva, respectivamente. Pelos menos cinco medidas foram tomadas em diferentes áreas de cada amostra usando água ($\gamma^p = 51 \text{ mN.m}^{-1}$, $\gamma^d = 21,8 \text{ mN.m}^{-1}$ e $\gamma = 72,8 \text{ mN.m}^{-1}$) e diiodometano ($\gamma^p = 0 \text{ mN.m}^{-1}$, $\gamma^d = 50,8 \text{ mN.m}^{-1}$ e $\gamma = 50,8 \text{ mN.m}^{-1}$), onde γ denota a tensão superficial do líquido e, γ^p e γ^d são as componentes polar e dispersiva de γ , respectivamente. A energia de superfície do sólido foi computada utilizando as componentes polar e dispersiva da energia de superfície do líquido de acordo com Owens (OWENS; WENDT, 1969).

4.2.9 Estabilidade morfológica dos filmes compósitos de BN-SiPs sob condições de fluxo

A estabilidade morfológica dos filmes foi analisada pelo imageamento das SiPs fluorescentes através da microscopia de fluorescência confocal. Os filmes foram montados em lamínulas circulares por meio do gotejamento de 100 μL das suspensões de BN-SiPs. Apenas os filmes formados com as sílicas de 700 nm, com uma concentração de partícula de 0,05 mg/mL foram utilizados neste teste de estabilidade. Visto que, as partículas de maior tamanho poderiam ser melhores resolvidas pela resolução da lente objetiva 20x e, uma menor concentração de SiPs forneceria também uma maior sensibilidade as mudanças no sinal de fluorescência. As lamínulas com os filmes compósitos foram montadas em uma câmara de perfusão POC-R2 (PeCon, Erbach, Alemanha) em modo fechado de perfusão. A câmara, por sua vez, foi conectada a uma bomba peristáltica Ismatec-IPC (Cole-Parmer, Wertheim, Alemanha), sendo a taxa de fluxo do fluido ajustada para $0,1 \text{ mL min}^{-1}$. Neste estudo, foram utilizados dois fluidos diferentes: água ultrapura (tipo 1) e solução salina (NaCl 0,85%). Colocou-se o sistema em um inserto de aquecimento P2000 (PeCon, Erbach, Alemanha) e manteve-se a temperatura do mesmo a 27 °C. As imagens foram adquiridas por uma lente objetiva 20x Plan-Apochromat (NA = 0,8, distância de trabalho = 0,55 mm), localizada sob o fundo da câmara de fluxo, em um microscópio confocal invertido LSM710 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) em cinco posições diferentes do filme escolhidas aleatoriamente. As imagens foram coletadas ao longo de 300 min com intervalos de 10 min de um processo de aquisição para outro. Um laser de argônio de 488 nm foi utilizado para excitar as SiPs marcadas com FITC e a emissão de fluorescência foi coletada na faixa de 504 a 540 nm.

4.2.10 Algoritmo para análise da distribuição e estabilidade das partículas de SiPs nos filmes compósitos de BN-SiPS

Aqui, a fluorescência das SiPs de 700 nm foi utilizada como um indicador, na avaliação da sua distribuição nos filmes compósitos e na estabilidade morfológica dos mesmos. As análises foram realizadas calculando-se (i) a porcentagem de área ocupada pelas SiPs (em comparação com toda a área digitalizada pela CLSM) ao longo do tempo; (ii) a menor distância média entre SiPs mais próximas ao longo do tempo e o número total de SiPs contabilizadas. O comportamento das SiPs foi avaliado conforme sua carga superficial, meio de fluxo testado (solução salina e água ultrapura) e solvente orgânico utilizado nas suspensões de BN (clorofórmio e tolueno). Para cada amostra, os dados foram coletados a partir de cinco posições diferentes resultando em um total de 1800 imagens montadas.

A análise das imagens para o estudo da sinalização local das SiPs foi realizada por meio de um algoritmo interno implementado na linguagem de programação *Python*, por meio dos módulos *Numpy*, *Seaborn*, *OpenCV*, *SciPy* e *Matplotlib* (ELLEFSEN et al., 2019). Tal processo envolveu as seguintes etapas: (i) aquisição/coleta das imagens (em CLSM); (ii) conversão dos dados de entrada (de imagens para matrizes *Numpy*); (iii) processamento dos dados e; (iv) plotagem dos dados. Uma função Gaussiana foi aplicada em cada uma das imagens confocais extraídas em escala de cinza, a fim de minimizar os ruídos das imagens. Esta etapa de convolução foi realizada utilizando um kernel 3x3 e um desvio padrão (STD, do inglês *standard deviation*) de 0,8. Em seguida, binarizou-se a imagem convoluída (suavizada) pelo método Otsu, no qual o valor de *threshold* (valor limite) foi ajustado individualmente.

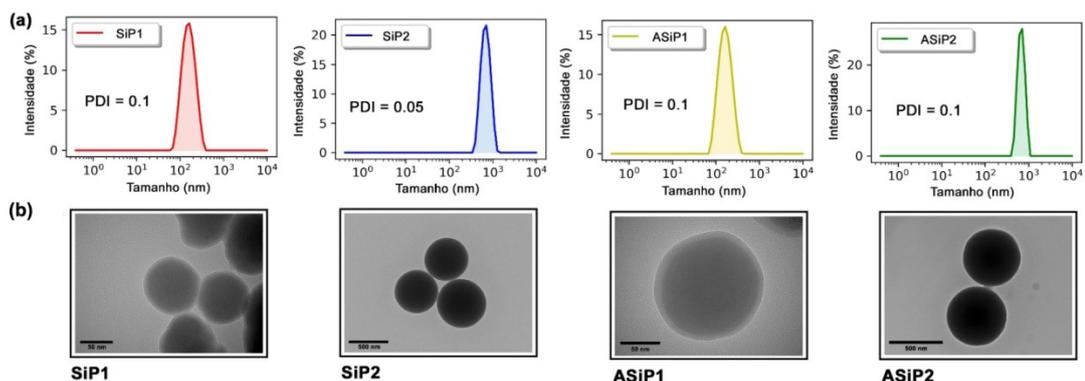
Com relação à área ocupada pelas SiPs, ela foi determinada por meio do cálculo da porcentagem de pixel contendo os sinais de fluorescência (representando as SiPs) comparada a área total varrida. A posição de cada partícula (ou aglomerados de SiPs) foi revelada e a distância média entre partículas e aglomerados (a distância Euclidiana) calculada relacionando-se o centroide de cada partícula (ou aglomerado) com todas as outras partículas na imagem. Sendo também determinada a média da distância do vizinho mais próximo, ou seja, a média das distâncias entre as partículas mais próximas considerando todas as partículas na imagem. Para todas essas etapas, foram utilizadas as bibliotecas *Numpy*, *OpenCV* e *Scipy*, e o *Matplotlib* para representação gráfica dos dados obtidos das imagens.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Caracterização das partículas de sílica fluorescentes

Primeiramente, caracterizou-se as SiPs *core-shell* geradas pelo método de Stöber modificado com núcleos fluorescentes, com duas distribuições de tamanho diferentes (150 nm e 700 nm) e cargas superficiais distintas. A Figura 20(a) mostra a distribuição de tamanho das SiPs (sintetizadas e amino-funcionalizadas) obtida por DLS para as amostras SiP1, SiP2, ASiP1 e ASiP2 com tamanhos de 149, 667, 154 e 678 nm, respectivamente, e com valores de índices de polidispersividade em torno de 0,1; além de valores de potencial zeta (ζ) equivalentes a -51 , -50 , $+40$ e $+54$ mV, respectivamente. Os valores de potencial zeta negativos surgem devido à exposição e desprotonação dos grupos hidroxilas na superfície das SiPs, enquanto os valores positivos das SiPs amino-funcionalizadas são atribuídos à protonação dos grupos amins na superfície das partículas. Partículas em suspensão necessitam de forças de repulsão suficientemente altas para diminuir sua propensão à aglomeração. É reconhecido, em geral, que suspensões de partículas com valores de potencial zeta superior a 30 mV são consideradas coloidalmente estáveis (CAO et al., 2018; SAHOO et al., 2013). Na Figura 20(b) está evidenciado a forma das SiPs fluorescentes e sua arquitetura *core-shell* obtidas por TEM. As partículas exibiram uma forma esférica, sem quaisquer mudanças morfológicas após o processo de amino-funcionalização.

Figura 20 - (a) Distribuição de tamanho e índices de polidispersividade (PDI, do inglês *polydispersity index*) das partículas de sílica sintetizadas (SiP1 and SiP2) e amino-funcionalizadas (ASiP1 and ASiP2) obtidos através do espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *dynamic light scattering*). (b) Imagens de TEM das SiPs mostrando sua forma esférica e arquitetura *core-shell*.

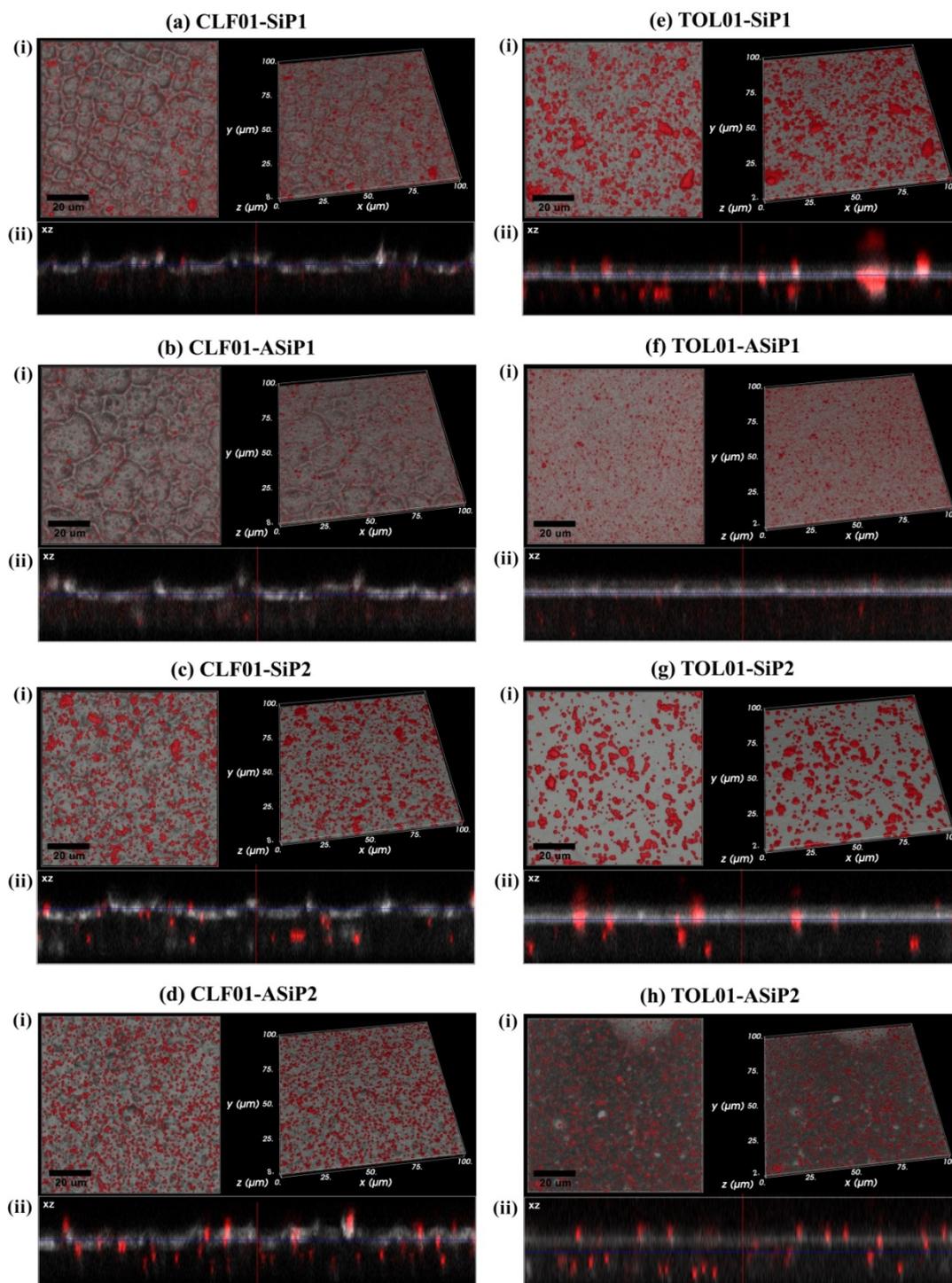


Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.2 Aspectos morfológicos e estruturais dos filmes compósitos de BN-SiPs

Após a incorporação das SiPs na matriz de BN, os aspectos morfológicos finais dos filmes compósitos foram avaliados pela correlação dos núcleos fluorescentes das SiPs e a autofluorescência da BN. A Figura 21 mostra o resultado do imageamento confocal 3D dos filmes compósitos de BN-SiPs produzidos utilizando-se clorofórmio e tolueno, com uma concentração final de SiPs de 0,1 mg/mL. Os resultados mostraram que os filmes compósitos apresentam morfologias distintas que dependem do tipo de solvente orgânico utilizado na preparação das suspensões de BN (solubilização). Os filmes compósitos de BN-SiPs produzidos a partir do clorofórmio (espessura de aproximadamente 7,5 μm) apresentaram características organizadas em sua superfície, um padrão de auto-organização conhecido na literatura como favo de mel. Como pode ser visto na Figura 21(b) e (d), a carga superficial das SiPs influenciou em sua distribuição ao longo da matriz de BN; as SiPs carregadas positivamente (ASiP1 e ASiP2) apresentaram uma distribuição homogênea ao longo da matriz, com partículas individualizadas, formando poucos aglomerados nos filmes. Em contraste, as SiPs carregadas negativamente (SiP1 e SiP2) apresentaram uma distribuição heterogênea ao longo da matriz, com poucas partículas individualizadas, formando aglomerados no filme, ver Figura 21 (a) e (c).

Figura 21 – (i) vista superior e 3D e (ii) secção transversal horizontal para $y = 50 \mu\text{m}$ das imagens de microscopia confocal de varredura a laser dos filmes compósitos de BN-SiPs produzidos a partir de BN (solubilizada em clorofórmio e tolueno) e partículas de SiPs (concentração de $0,1 \text{ mg/mL}$). Em (a) CLF01-SiP1, (b) CLF01-ASiP1, (c) CLF01-SiP2, (d) CLF01-ASiP2, (e) TOL01-SiP1, (f) TOL01-ASiP1, (g) TOL01-SiP2 e (h) CLF01-ASiP2. O mapeamento foi realizado utilizando diferentes comprimentos de onda, a autofluorescência da BN e os núcleos fluorescentes das SiPs foram excitados usando laser de 405 e 488 nm, respectivamente. O canal da BN está representado pela cor cinza e o canal das SiPs pela cor vermelha.

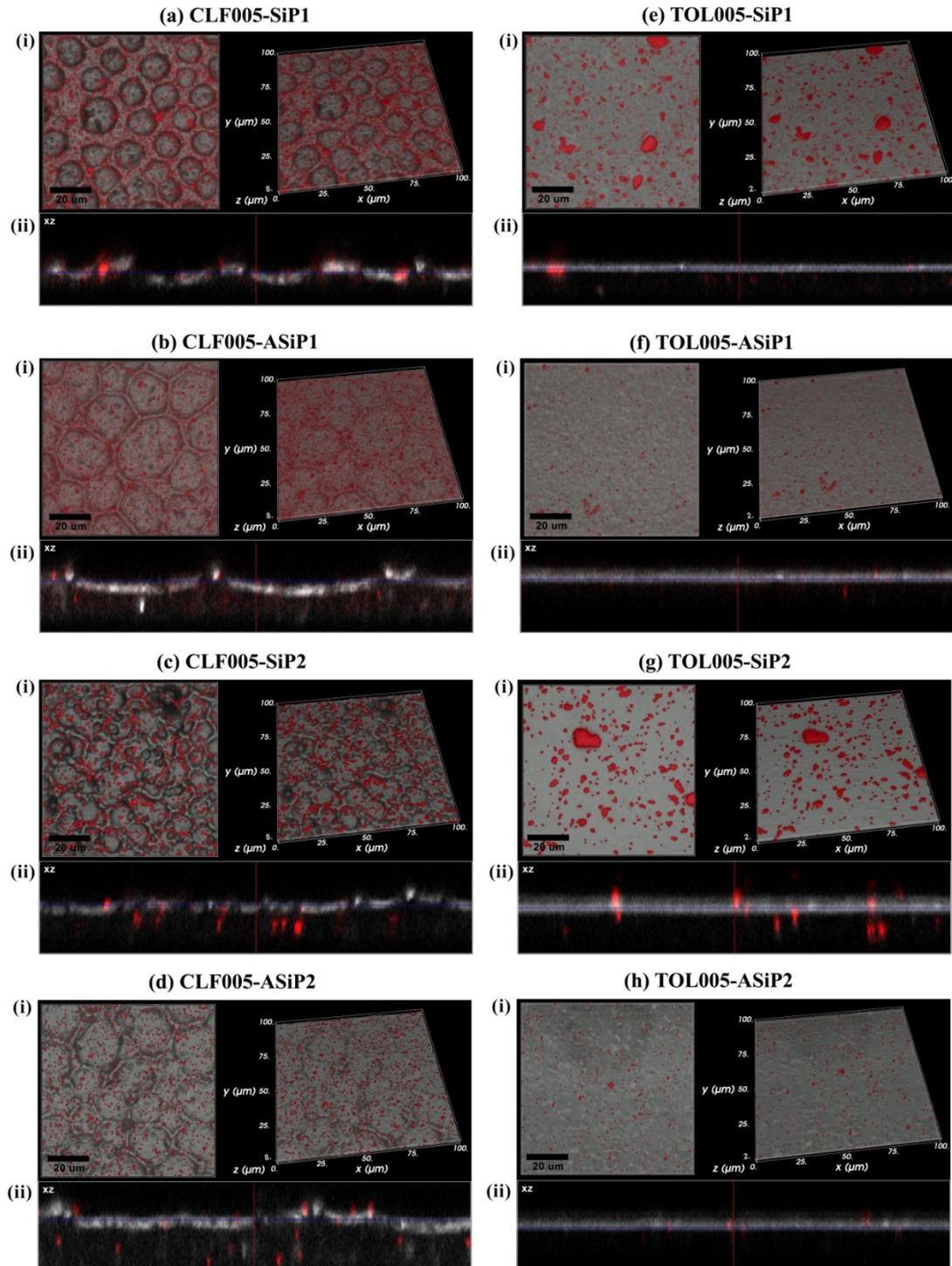


Fonte: Elaborado pela autora.

Os filmes compósitos produzidos com clorofórmio com uma concentração final de SiPs de 0,5 mg/mL exibiram o mesmo padrão de favo de mel e uma distribuição de SiPs similar àqueles produzidos em clorofórmio com uma concentração de SiPs de 0,1 mg/mL, ver Figura 22(a), (b), (c) e (d). Como já reportado na literatura para filmes copolímeros em bloco de poliestireno-poliparafenileno (PS-PPP), o padrão favo de mel pode ser explicado pelo mecanismo do processo de automontagem de figuras de respiração (WIDAWSKI; RAWISO; FRANÇOIS, 1994). A afinidade termodinâmica entre o polímero e o solvente é um parâmetro chave para a formação de figuras de respiração; após o solvente (clorofórmio) ser completamente evaporado, gotículas condensadas na interface solução/ar formam um filme poroso no substrato. O tamanho e a regularidade dos poros podem ser controlados alterando quaisquer parâmetros experimentais que afetem o processo de formação do filme padrão favo de mel, como por exemplo, solventes, temperatura e hidrofobicidade do substrato (como, as lamínulas utilizadas aqui) (CHENG et al., 2005; WAN et al., 2014).

A Figura 21(e), (f), (g) e (h) mostra a morfologia dos filmes compósitos BN-SiPs (espessura de aproximadamente 1,5 μm) com superfícies um tanto planas produzidos a partir das suspensões de BN em tolueno com uma concentração final de SiPs de 0,1 mg/mL. Com relação à distribuição das SiPs na matriz polimérica de BN, a influência da carga superficial das SiPs foi similar ao comportamento observado nos filmes compósitos produzidos em clorofórmio. As SiPs carregadas negativamente (SiP1 e SiP2) são distribuídas heterogeneamente, formando aglomerados ao longo do filme (ver Figura 21(e) e (g)). Contudo, os aglomerados foram mais acentuados nos filmes em tolueno do que aqueles observados para os filmes compósitos em clorofórmio, ver Figura 21(a) e (c). As SiPs carregadas positivamente (ASiP1 e ASiP2) apresentaram uma distribuição homogênea ao longo da matriz, além de partículas individualizadas acentuadas, com poucos aglomerados, ver Figura 21(f) e (h). Os filmes compósitos produzidos a partir do tolueno com uma concentração final de SiPs de 0,05 mg/mL exibiram as mesmas características, ver Figura 22(e), (f), (g) e (h). A afinidade termodinâmica entre a BN e o tolueno pode explicar o porquê do padrão favo de mel não ser observado nesses filmes compósitos. A baixa volatilidade do tolueno a temperatura ambiente ocasiona em um processo de evaporação lento, o qual não favorece o resfriamento superficial necessário à condensação de água na superfície da solução polimérica durante sua secagem (FERRARI; FABBRI; PILATI, 2011).

Figura 22 - (i) vista superior e 3D e (ii) secção transversal horizontal para $y = 50 \mu\text{m}$ das imagens de microscopia confocal de varredura a laser dos filmes compósitos de BN-SiPs produzidos a partir de BN (solubilizada em clorofórmio e tolueno) e partículas de SiPs (concentração de $0,1 \text{ mg/mL}$). Em (a) CLF01-SiP1, (b) CLF01-ASiP1, (c) CLF01-SiP2, (d) CLF01-ASiP2, (e) TOL01-SiP1, (f) TOL01-ASiP1, (g) TOL01-SiP2 e (h) CLF01-ASiP2. O mapeamento foi realizado utilizando diferentes comprimentos de onda, a autofluorescência da BN e os núcleos fluorescentes das SiPs foram excitados usando laser de 405 e 488 nm, respectivamente. O canal da BN está representado pela cor cinza e o canal das SiPs pela cor vermelha.



Fonte: Elaborado pela autora.

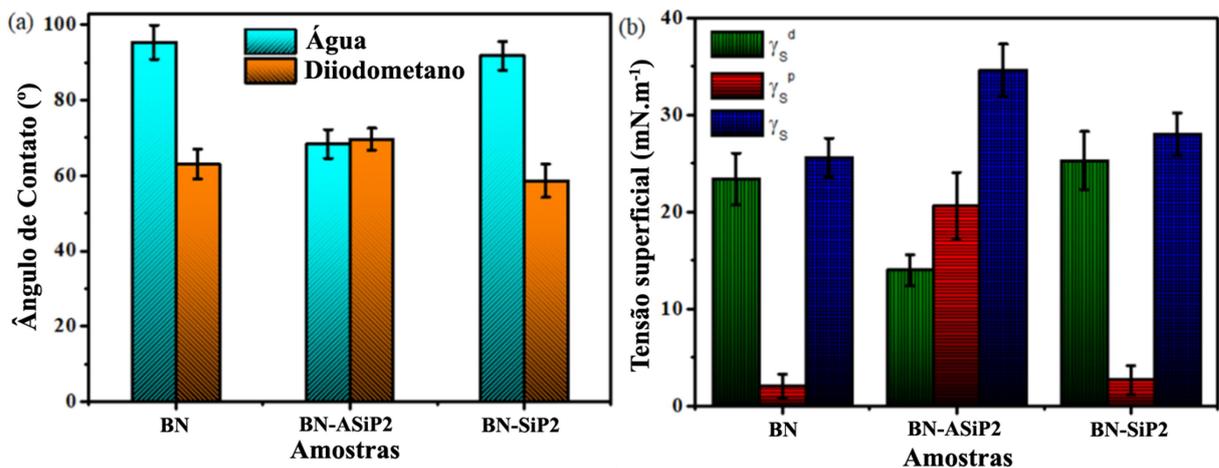
A distribuição espacial das SiPs ao longo das matrizes de BN é afetada pela (i) carga superficial média das SiPs e BN, a qual determinará as interações eletrostáticas, entre os dois sistemas químicos; (ii) a polaridade dos solventes orgânicos utilizados; (iii) o estado de protonação/desprotonação das proteínas que constituem as partículas de BN. A superfície das partículas de BN tem uma natureza anfotérica com um ponto isoelétrico (pH_{pzc}) em pH 3,8. Quando $pH > pH_{pzc}$, a partícula de BN apresenta uma superfície carregada negativamente devido aos grupos desprotonados, ou seja, grupos carboxílicos de proteínas adsorvidas e ácidos graxos de cadeias longas adsorvidos, ambos responsáveis por sua estabilidade.

Aqui, os solventes orgânicos (clorofórmio e tolueno) foram usados para dissolver a borracha sem a hidrólise completa de grupos amino das proteínas em um meio de pH básico elevado (HO; NG, 1979), ou seja, uma condição de contorno. A agregação das SiPs na matriz polimérica pode estar relacionada a característica de apolaridade desses solventes. As SiPs hidrofílicas, como SiP1 e SiP2 (carregadas negativamente), são bem dispersas em solventes polares; mas apresentam instabilidade em dispersantes apolares, levando à aglomeração. Tal comportamento pode ser entendido em termos da teoria Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), cujo aumento da atração de van der Waals é superior à repulsão eletrostática entre as partículas (LEE et al., 2014). Dependendo do tamanho do coloide, o efeito pode ser mais evidente, isto é, partículas menores tendem a ser bem mais sensíveis ao meio composicional. Por outro lado, as SiPs hidrofóbicas, como ASiP1 e ASiP2 (carregadas positivamente), possuem um comportamento oposto como resultado do enxerto de polímero na superfície da partícula após o processo de amino-funcionalização, permitindo assim uma estabilização estérica (BADLEY et al., 1990; VINCENT et al., 1990). A carga positiva e a camada polimérica na superfície de ASiP1 e ASiP2 pode interagir com os ácidos graxos de cadeia longa presentes nas suspensões de BN (KAWAHARA et al., 2000), deixando as suspensões mais estáveis; apesar da existência de grupos ésteres carregados negativamente associados aos fosfolipídios.

O clorofórmio e o tolueno exibem momentos de dipolo diferentes, portanto, a redução do potencial zeta das SiPs e da BN pode estar ocorrendo como resultado das interações com o solvente e entre si. A variação da densidade de carga superficial é uma função do pH e do tamanho das SiPs, o valor de potencial zeta se torna mais negativo a medida que o pH das SiPs aumenta e o seu tamanho diminui. O caráter hidrofóbico da BN devido à presença das cadeias de poliisopreno, ácidos graxos e proteínas dissolvidas também contribuem para esse comportamento. E apesar da superfície carregada negativamente da BN, seu número pode ter sido reduzido em clorofórmio ao ponto que as interações de curto

alcance podem estar superando-o. Além disso, alguns aminoácidos ativos carregados positivamente do conteúdo proteico presente na fração de gel insolúvel da BN podem estar interagindo com as SiPs via forças eletrostáticas (NUN-ANAN et al., 2018; WADEESIRISAK et al., 2017), promovendo aglomerações sob condições de secagem e resultando na formação de micro-aglomerados de BN-gel/SiPs, ver a distribuição das SiPs na Figura 21 e 22. Adicionalmente, a incorporação das SiPs na BN afeta também a tensão superficial e molhabilidade da superfície dos filmes compósitos. Após a incorporação das ASiPs, observou-se um aumento significativo nas componentes polares da BN, isto é, de $2,1 \pm 1,2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ para $20,6 \pm 3,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, como mostrado pelas medidas de ângulo de contato usando líquidos polares e apolares, ver Figura 23. Esses resultados indicam que a molhabilidade da superfície dos filmes compósitos pode ser modulada via incorporação das SiPs; assim, abrindo novos horizontes para aplicações biomédicas, como por exemplo, aumentando a adesão celular (DO NASCIMENTO et al., 2019c) e capacidade de sobrevivência (MARCELO et al., 2021) ou evitando a coagulação sanguínea (DO NASCIMENTO et al., 2019d).

Figura 23 – Medidas de ângulo de contato e de energia livre de superfície e seus componentes para os filmes compósitos de BN-SiPs.

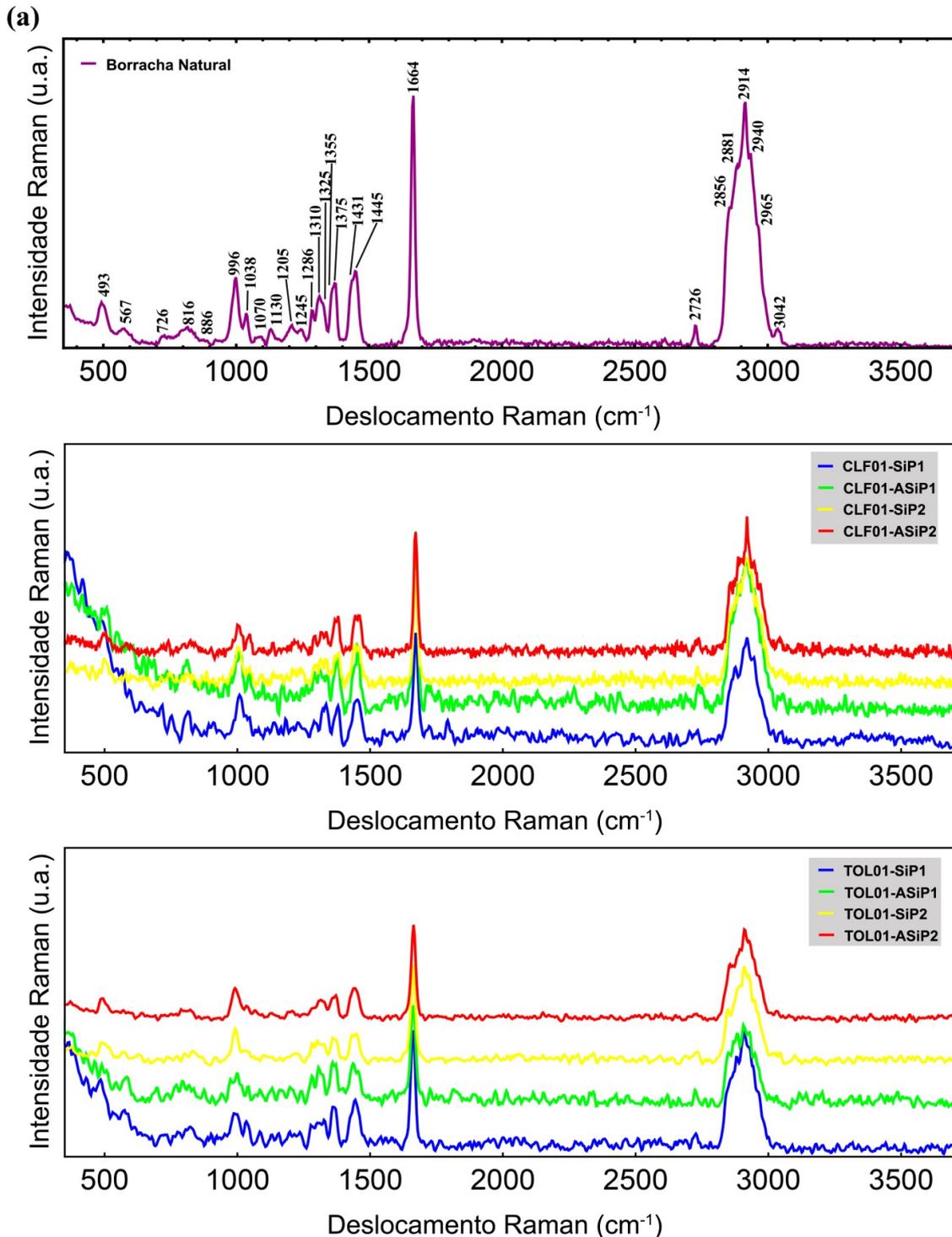


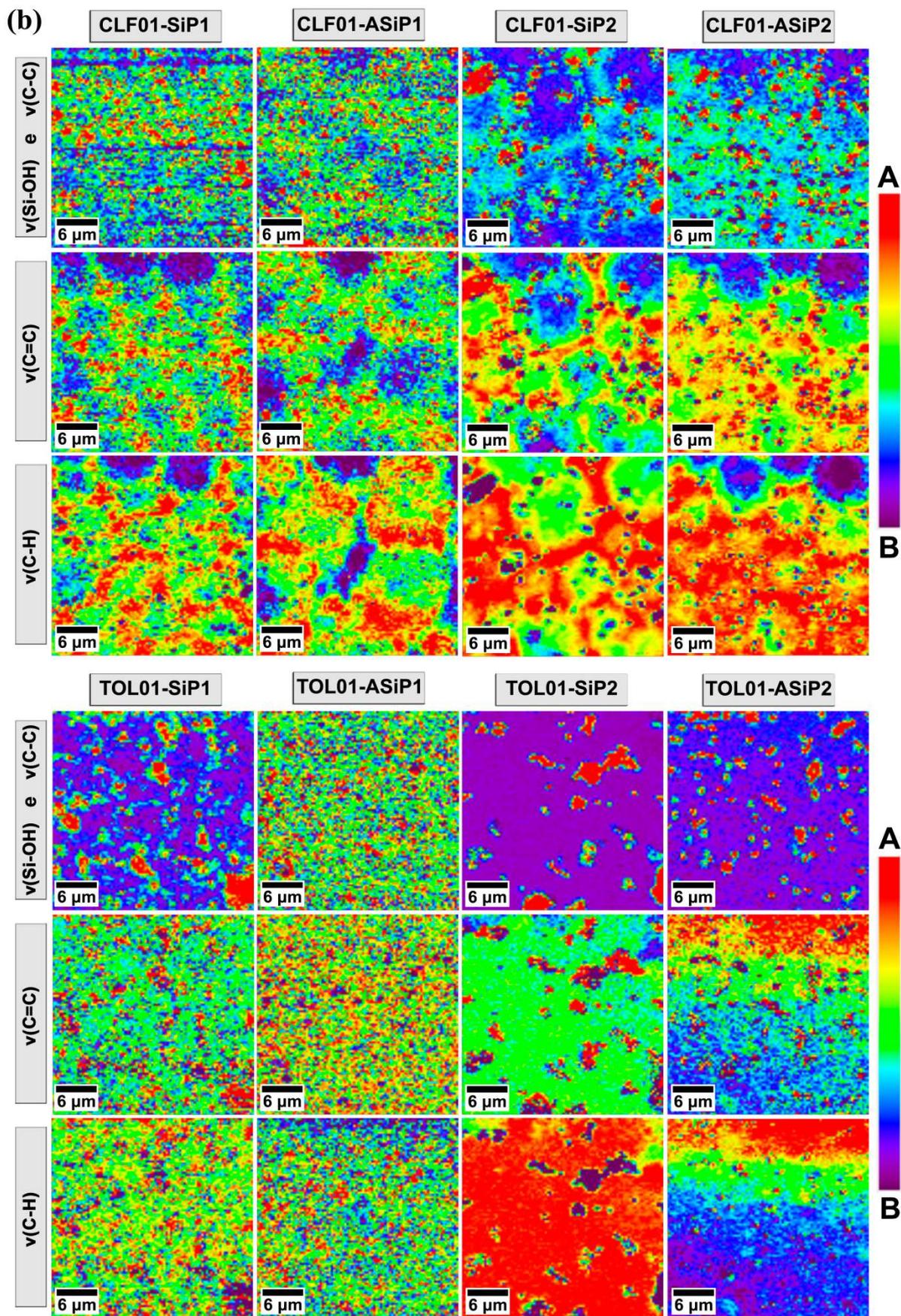
Fonte: Elaborada pela autora.

A fim de avaliar possíveis modificações na distribuição química dos grupos moleculares presentes na BN depois da incorporação das SiPs, a microscopia Raman confocal foi realizada em todos os filmes compósitos de BN-SiPs. A Figura 24(a) mostra os espectros Raman medidos usando um laser de $\lambda = 532 \text{ nm}$ (temperatura ambiente) para o polímero BN e os filmes compósitos de BN-SiPs com uma concentração de SiPs de $0,1 \text{ mg/mL}$. As bandas

características da estrutura macromolecular da BN predomina nos espectros Raman, tais como as bandas muito intensas do CH₂ e CH₃ assinadas pelo estiramento C-H na região de 3000-3200 cm⁻¹, o modo de estiramento do C=C em 1660-1680 cm⁻¹ e o estiramento C-C em 1000-975 cm⁻¹ (CORNELL; KOENIG, 1969; NALLASAMY; MOHAN, 2004; PRASERTSRI et al., 2013; SAKDAPIPANICH et al., 2015). As bandas características das SiPs aparecem em 456 e 796 cm⁻¹ assinadas pelas vibrações de estiramento do Si-O-Si e em 994 cm⁻¹ pelas vibrações do Si-OH. Além disso, a BN também exibiu bandas características nessas regiões, em 493 cm⁻¹ atribuída às deformações angulares assimétrica e simétrica no plano do =CC₂, em 728 cm⁻¹ à deformação angular assimétrica no plano do CH₂ e em 996 cm⁻¹ assinada pela vibração de estiramento do C-C (AGUIAR et al., 2009; CORNELL; KOENIG, 1969; HENDRA; JACKSON, 1994; NALLASAMY; MOHAN, 2004; PRASERTSRI et al., 2013). É importante mencionar que, os modos de estiramento do C-H atribuídos ao CH₂ e CH₃ aparecem também devido à presença de cadeias fosfolipídicas e de proteínas da composição química da BN (DO NASCIMENTO et al., 2019a).

Figura 24 - (a) espectros Raman adquiridos utilizando uma excitação de $\lambda=532$ nm (temperatura ambiente) para a fase creme de borracha natural seca e para os filmes compósitos de BN-SiPs produzidos a partir de clorofórmio e tolueno (concentração final das SiPs de 0,1 mg/mL). (b) mapeamento espectral Raman da superfície dos filmes compósitos de BN-SiPs tomado em uma escala de tamanho micrométrica. Os perfis de intensidade foram adquiridos com as bandas centralizadas em 2915, 1665 e 1000 cm^{-1} , correspondendo às regiões espectrais atribuídas aos seguintes modos de vibração: estiramento C-C e Si-OH, estiramento C=C e estiramento C-H. Nos painéis, a cor vermelha representa alta intensidade (A) e a cor roxa baixa intensidade (B).





Fonte: Elaborado pela autora.

Um padrão espectral similar foi observado nos filmes compósitos de BN-SiPs com uma concentração de SiPs de 0,05 mg/mL, ver Figura 25(a). Todas as posições e atribuições das bandas observadas nos espectros Raman estão fornecidas na Tabela 8. A Figura 24(b) mostra as imagens espectroscópicas Raman das superfícies dos filmes compósitos de BN-SiPs com uma concentração final de SiPs de 0,1 mg/mL tomadas em escala de tamanho micrométrica. Os perfis de intensidade foram adquiridos com bandas centralizadas em 2915, 1665 e 1000 cm^{-1} , correspondendo às regiões espectrais descritas a baixo. O estiramento do C-H [$\nu(\text{C-H})$] mostra a distribuição química espacial das cadeias fosfolipídicas e estruturas proteicas da BN, incluindo o padrão favo de mel observado nos filmes compósitos produzidos a partir do clorofórmio, ver amostras CLF01-SiP1, CLF01-ASiP1, CLF01-SiP2 e CLF01-ASiP2 na Figura 24(b). O perfil de intensidade do estiramento C=C [$\nu(\text{C=C})$] desvenda a distribuição do poliisopreno que é o principal constituinte químico da matriz de BN; como o perfil anterior, ele também revela o padrão favo de mel das amostras produzidas a partir do clorofórmio, ver amostras CLF01-SiP1, CLF01-ASiP1, CLF01-SiP2 e CLF01-ASiP2 na Figura 24(b). Por outro lado, as imagens espectroscópicas do estiramento do C-C [$\nu(\text{C-C})$] e Si-OH [$\nu(\text{Si-OH})$], sinais atribuídos à matriz de BN e SiPs, respectivamente, mostram a distribuição química espacial dos dois sinais sobrepostos. Esta sobreposição acontece porque [$\nu(\text{C-C})$] e [$\nu(\text{Si-OH})$] possuem bandas centralizadas na mesma região espectral (996 cm^{-1} e 994 cm^{-1} , respectivamente).

Tabela 8 - Posições e atribuições das bandas de *cis*-1,4-poliisopreno observadas nos espectros Raman dos filmes compósitos de BN-SiPs.

Deslocamento Raman (cm^{-1})	Atribuições
3042	Estiramento =CH
2965	Estiramento assimétrico CH_3
2940	Estiramento assimétrico CH_2
2914	Estiramento simétrico CH_3
2881	Estiramento simétrico CH_2
2856	Estiramento simétrico CH_3
2726	<i>Não identificado</i>
1664	Estiramento C=C
1445	Deformação CH_2

Continua

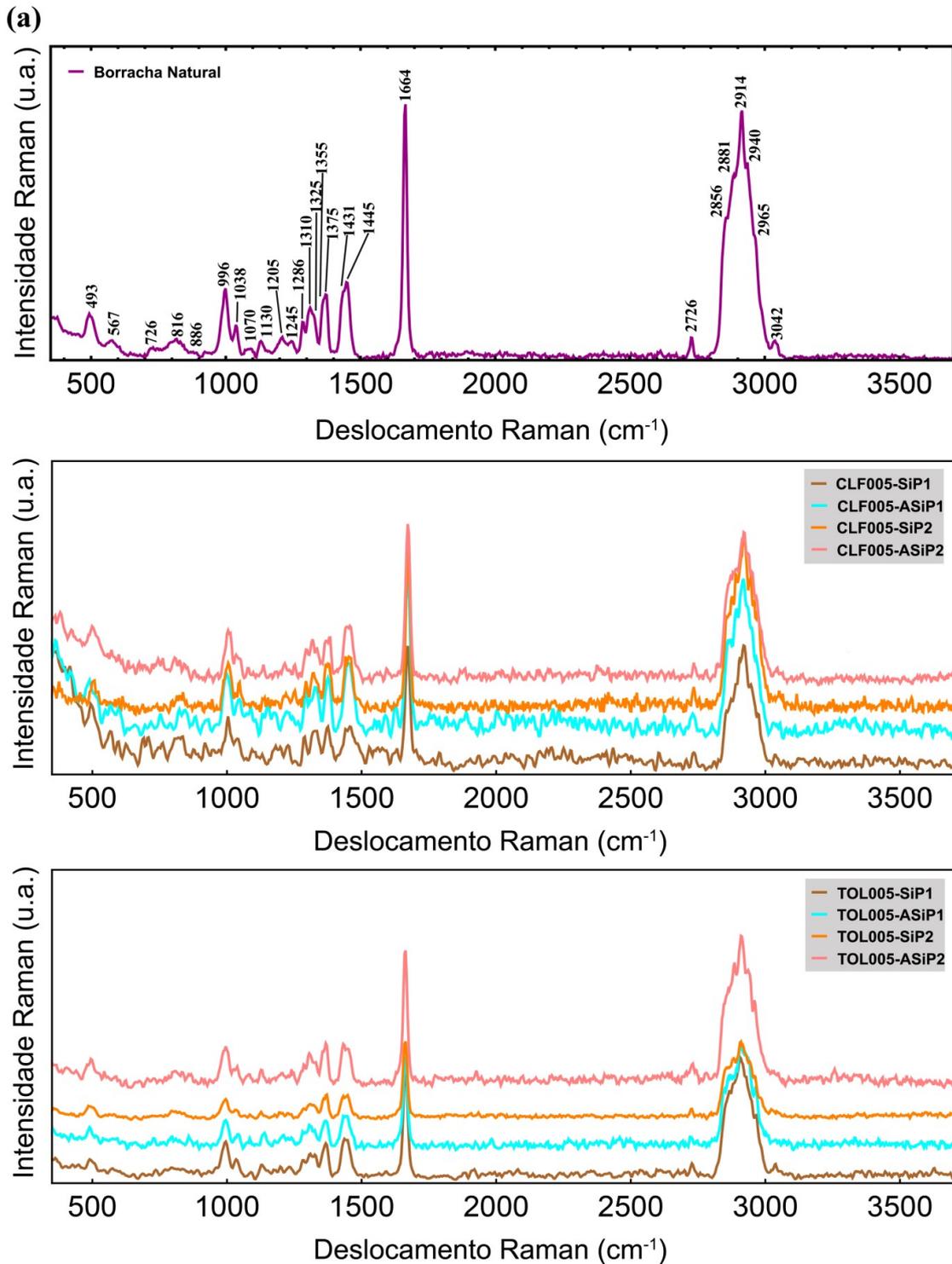
Deslocamento Raman (cm ⁻¹)	Atribuições
1431	Deformação CH ₂
1375	Deformação assimétrica CH ₃
1355	Deformação assimétrica CH ₃
1325	Deformação simétrica CH ₃
1310	Balanço CH ₂
1286	Dobramento no plano =CH
1245	Torção CH ₂
1205	Balanço CH ₂
1130	Estiramento C-C
1070	Torção CH ₂
1038	Rotação CH ₃
996	Estiramento C-C
886	Balanço CH ₃
816	Dobramento fora do plano =CH
726	Rotação CH ₂
567	Deformação C-C-C
493	Deformação C-C-C

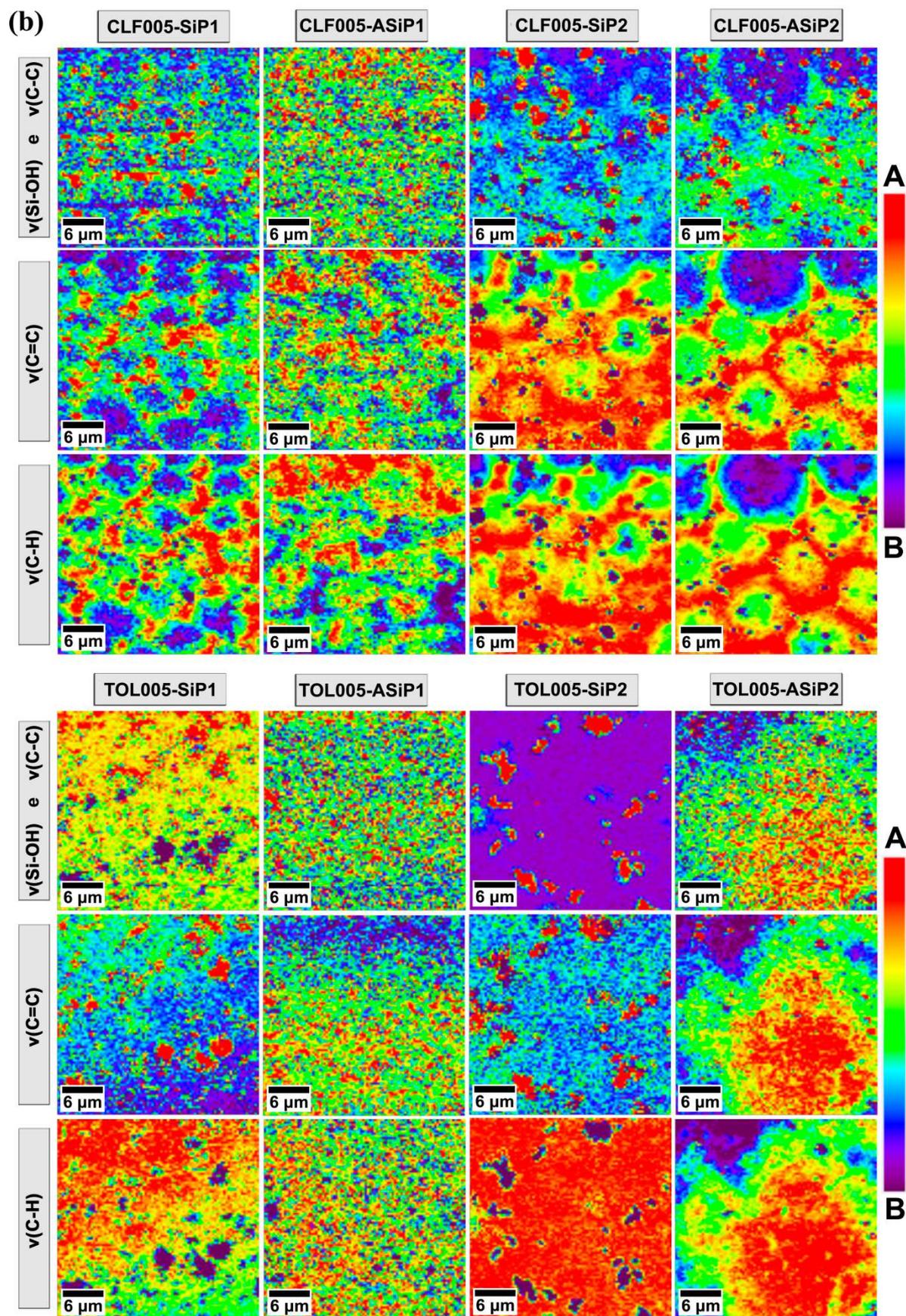
Fonte: Elaborado pela autora.

Resultados similares foram observados para as imagens espectroscópicas dos filmes compósitos de BN-SiPs com uma concentração final de SiPs de 0,05 mg/mL, ver Figura 25(b). Os espectros dos filmes compósitos exibiram as mesmas bandas características da estrutura macromolecular da BN. Eles não apresentaram dependência dos diferentes solventes utilizados para solubilizar a BN, nem da concentração, tamanho e carga das SiPs incorporadas. Em termos das características estruturais, a fase creme da BN usada neste estudo é composta de um sistema coloidal (partículas de borracha e não borracha) formado a partir de uma estrutura *core-shell* com moléculas de isopreno rodeadas por proteínas e fosfolipídios ligados por dois grupos de cadeia terminais, terminal- α e terminal- ω (NAWAMAWAT et al., 2011). O *background* luminescente da BN é associado à presença desses grupos terminais (NASCIMENTO et al., 2014), aos componentes fosfolipídicos (terminal- α) e estruturas oligopeptídicas das proteínas (terminal- ω) (TANAKA, 2001; TARACHIWIN et al., 2005). Em particular, a autofluorescência da borracha natural, como visualizada aqui nos filmes compósitos de BN-SiPs, é atribuída à emissão de estruturas

distintas dos aminoácidos presentes nas proteínas das partículas de BN. Portanto, a autofluorescência da BN visualizada nos filmes compósitos, ver Figura 21 e 22, pode ser atribuída a essas emissões das estruturas distintas presentes nos aminoácidos (proteínas) das partículas de BN. Nos espectros Raman, os modos vibracionais desses aminoácidos foram observados na região espectral de $2820-3030\text{ cm}^{-1}$, ver Figura 24(a) e 25(a). A capacidade das partículas não borracha do sistema coloidal da BN de encapsular micropartículas foi revelada a partir dessas propriedades (NASCIMENTO et al., 2014). O processamento do látex pode originar outros efeitos óticos. Por exemplo, o hidróxido de amônia usado no seu processo de estabilização promove a hidrólise de proteínas e lipídios, levando a geração de polipeptídios e aminoácidos (BLACKLEY, 1997; CABRERA et al., 2014; DANNA et al., 2017). Contudo, o sinal ótico da BN não é estável e sofre um efeito de supressão da fluorescência (*quenching*) com menos de 10 passos de varredura. Por outro lado, as SiPs *core-shell* fluorescentes retêm o sinal fluorescente mesmo após 100 passos de varredura. Nesse sentido, um dos aspectos chave da abordagem de imageamento apresentada neste trabalho, é correlacionar a fluorescência proveniente dos núcleos das SiPs com a autofluorescência da BN, possibilitando a observação da morfologia e da estabilidade estrutural dos filmes compósitos de BN-SiPs.

Figura 25 – (a) espectros Raman adquiridos utilizando uma excitação de $\lambda=532$ nm (temperatura ambiente) para a fase creme de borracha natural seca e para os filmes compósitos de BN-SiPs produzidos a partir de clorofórmio e tolueno (concentração final das SiPs de 0,05 mg/mL). (b) mapeamento espectral Raman da superfície dos filmes compósitos de BN-SiPs tomado em uma escala de tamanho micrométrica. Os perfis de intensidade foram adquiridos com as bandas centralizadas em 2915, 1665 e 1000 cm^{-1} , correspondendo às regiões espectrais atribuídas aos seguintes modos de vibração: estiramento C-C e Si-OH, estiramento C=C e estiramento C-H. Nos painéis, a cor vermelha representa alta intensidade (A) e a cor roxa baixa intensidade (B).



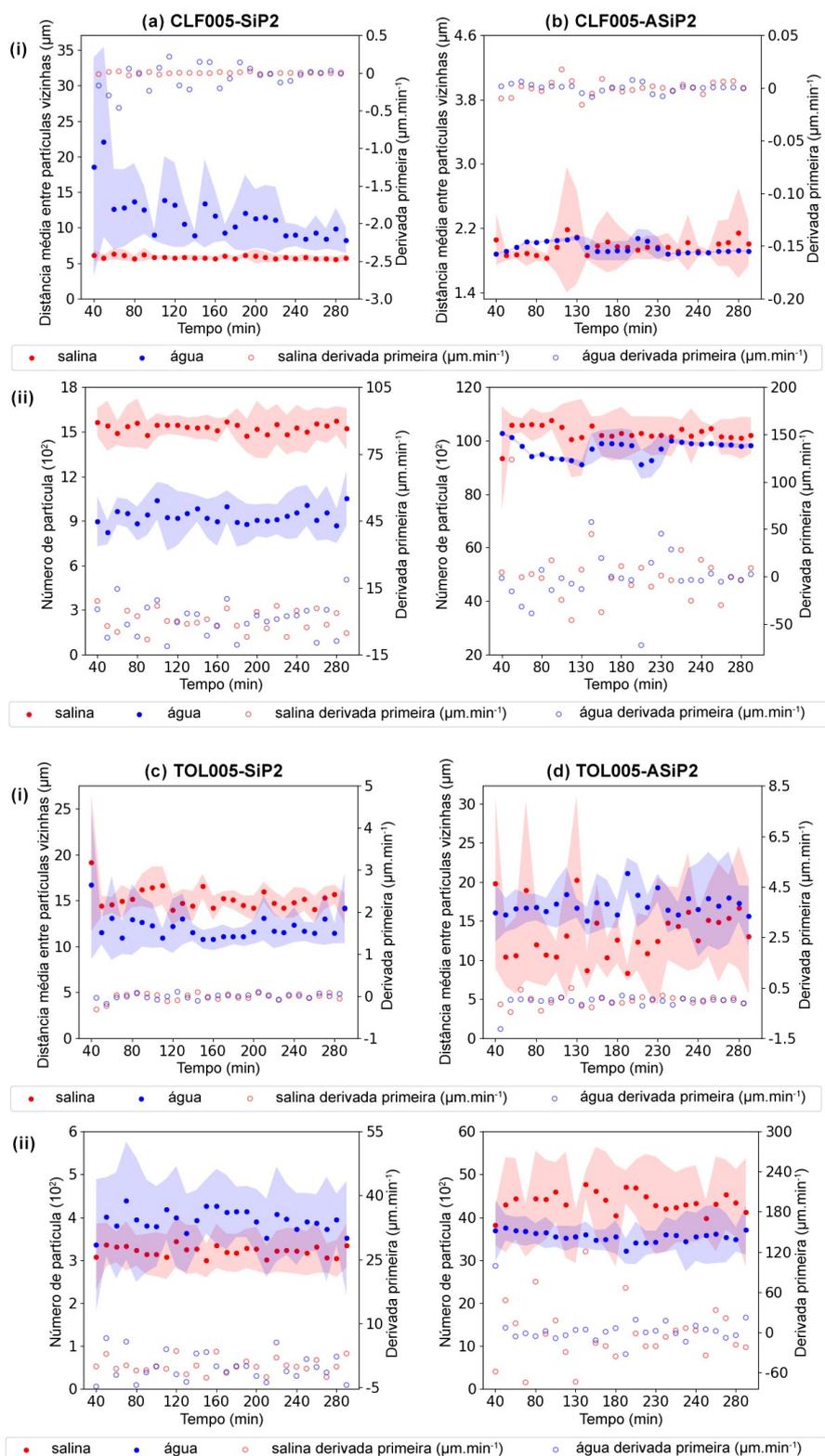


Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.3 Estabilidade morfológica dos filmes compósitos de BN-SiPs

A investigação da estabilidade morfológica dos filmes compósitos foi realizada por meio do monitoramento ao longo do tempo do sinal de fluorescência das SiPs incorporadas aos filmes. As SiPs foram sondadas em uma câmara de fluxo usando água ultrapura e solução salina (NaCl 0,85%) como fluxo líquido. As imagens analisadas continham um sinal de fluorescência emitido por uma fatia ótica de 3,2 μm do filme compósito. O número de partículas exibiu uma diferença significativa entre os filmes compósitos produzidos a partir do clorofórmio, principalmente para aqueles com SiPs carregadas positivamente, ver linha (ii) na Figura 26 (a) e (b). De acordo com a Figura 26(a) e (b), a distância média entre partículas vizinhas diminuiu com o aumento do número de partículas, sendo menor para CLF005-ASiP2 quando comparada a CLF005-SiP2, ver linha (i) na Figura 26(a) e (b). Esses resultados estão associados à aglomeração acentuada das SiPs carregadas negativamente, como visto nas imagens de CLSM, ver Figura 22(c) e (d). Portanto, para a mesma concentração final de SiPs (0,05 mg/mL), quanto mais aglomerados, menor a ocupação espacial (número de partícula) e maior a distância média partícula-partícula observada em uma fatia ótica capturada por CLSM. Tais efeitos são evidentes, particularmente, para as SiPs carregadas negativamente incorporadas a matriz de BN em ambos os sistemas de fluxo, ver linhas (i) e (ii) na Figura 26(a) e (b).

Figura 26 - Resultados da análise de estabilidade morfológica dos filmes compósitos de BN-SiPs produzidos a partir do clorofórmio e tolueno com uma concentração final de SiPs de 0,05 mg/mL pelo imageamento de fluorescência das SiPs por microscopia confocal fluorescente. (a) e (d) relata a porcentagem de área ocupada, (b) e (e) número de partícula, e (c) e (f) distância média entre partículas vizinhas das SiPs fluorescentes. As áreas sombreadas em azul e vermelho indicam o desvio padrão (STD, do inglês *standard deviation*).



Fonte: Elaborado pela autora.

Uma diferença significativa no número de partícula também foi observada para os filmes compósitos de BN-SiPs produzidos a partir do tolueno. Os filmes incorporados com SiPs carregadas positivamente mostraram um maior número de partícula quando comparados àqueles com SiPs carregadas negativamente, ver linha (ii) na Figura 26(c) e (d). Por outro lado, a distância média de partículas vizinhas mostraram valores similares para os filmes compósitos produzidos a partir do tolueno em ambos os sistemas, ver Figura 26(c) e (d). Esses resultados podem ser uma consequência da distribuição individual acentuada das SiPs carregadas positivamente comparadas as SiPs carregadas negativamente, como observado nas imagens de CLSM, ver Figura 22(g) e (h). Nesse sentido, para a mesma concentração final de SiPs (0,05 mg/mL), o aumento na distribuição individual das partículas leva a uma maior ocupação espacial (número de partícula) e a uma menor distância média partícula-partícula. Esses efeitos são evidentes, particularmente, para as SiPs carregadas positivamente incorporadas a matriz de BN em ambos os sistemas de fluxo, ver linhas (i) e (ii) na Figura 26(c) e (d).

De acordo com os resultados apresentados aqui, se pode inferir que o sinal ótico das SiPs permanece constante ao longo do tempo, assim implicando que o fluxo do fluido no sistema não está promovendo a lixiviação das partículas. Nesse tipo de análise, é comum se observar variações no sinal de fluorescência atribuídas ao *drift* local gerado a partir de flutuações de temperatura entre os componentes do sistema experimental (amostra, lentes, ambiente, fluido e outros). Além disso, o microscópio foi configurado para realizar as análises em um modo de autofocus que seleciona o plano de maior intensidade de sinal no eixo Z para a aquisição de imagem. Um comportamento de intumescimento foi observado para os filmes compósitos na presença dos fluidos, acarretando em um aumento de suas extensões no eixo Z. Utilizando-se as SiPs como um modelo de sondagem, os resultados obtidos neste trabalho mostraram a estabilidade morfológica dos filmes compósitos de BN-SiPs, assim expandindo possibilidades de aplicações tecnológicas dos compósitos de BN em situações cuja resistência/estabilidade sob fluxo de fluido é requerida. Além do mais, a homogeneidade notável das sondas carregadas positivamente através da matriz de BN também apresenta um potencial elevado a ser explorado em investigações futuras, uma vez que o desenvolvimento de dispositivos baseados em compósitos poliméricos depende de propriedades físicas fundamentais, tais como módulo de elasticidade, dureza, resistência ao escoamento, adesão interfacial e tenacidade à fratura. Do ponto de vista de uma perspectiva tecnológica, o material compósito pode ser aplicado no recobrimento de superfícies de biomateriais metálicos ou de embarcações marinhas que sofrem arrastamentos hidrodinâmicos.

4.4 Conclusões

Na literatura, a compreensão dos mecanismos associados com as propriedades física e química das borrachas naturais reforçadas ainda não são completamente elucidados (ARDYANI et al., 2019). De forma que, as descobertas realizadas aqui contribuem para os avanços desse entendimento, por meio da utilização das SiPs como sonda química (enchimento) e física (emissão de luz) nos compósitos de BN. Apesar das nano- e micropartículas de sílica exibirem uma baixa afinidade com a matriz de BN em sistemas poliméricos reforçados (BOKOBZA, 2018), aqui tem sido mostrado, pela incorporação de nano- e micropartículas de sílica *core-shell* esférica fluorescentes monodispersas na matriz de BN, que mesmo as partículas de sílica com grupos silanóis (ou seja, carregadas negativamente) podem ser incorporadas à matriz de borracha. Além disso, quando a superfície da SiO₂ se torna carregada positivamente (pela modificação com o APTMS), uma correlação tem sido encontrada entre o tamanho e a quantidade de partículas incorporadas a matriz polimérica. Uma mudança notável na morfologia dos filmes compósitos de BN-SiPs foi ligada aos solventes orgânicos utilizados, mantendo sua composição química. Para evitar possíveis danos e modificações as amostras como um resultado da interferência de técnicas de caracterização, adaptou-se aqui uma abordagem analítica microfluídica muito usada nas áreas de microbiologia e biologia celular para avaliar a dinâmica de crescimento de células e micróbios (PAULA; HWANG; KOO, 2020; REN et al., 2019). No presente trabalho, todas as características morfológicas dos filmes compósitos de BN-SiPs foram visualizadas *in situ* sem afetar as características das amostras. O conceito de análise morfológica *in situ* dos enchimentos nos compósitos de BN também foi explorado, analisando-se como o estado dos filmes muda em função do tempo e sob condições de fluxo líquido. Para demonstrar o poder dessa abordagem de imageamento aplicada a revestimentos compósitos, os dados 4D produzidos, ou seja, as pilhas de imagens resolvidas no tempo foram analisadas por meio de algoritmos de processamento de imagem modernos que rastreiam a posição das partículas de sílica, a distância média entre partículas vizinhas e a intensidade de sinal. A excelente estabilidade morfológica dos filmes compósitos de BN-SiPs foi evidenciada mesmo sob uma solução de alta força iônica (tampão PBS) como fluido na câmara de fluxo. Além das descobertas sobre os aspectos morfológico-estruturais dos filmes compósitos e de sua estabilidade sob fluxo, a abordagem utilizada na investigação da estabilidade morfológica de compósitos com parâmetros facilmente mensuráveis, como os mostrados na Figura 26, oferecem valor prático para pesquisa aplicada e desenvolvimento. Ademais, utilizando a

metodologia apresentada aqui, o desempenho de filmes compósitos baseados em BN usados como revestimentos pode ser previsto independentemente das suas estabilidades física e química (DO NASCIMENTO et al., 2019a; TRAN et al., 2019; YONG; ANG; SARIH, 2019).

Referências

- AGUIAR, H. et al. Structural study of sol-gel silicate glasses by IR and Raman spectroscopies. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 355, n. 8, p. 475–480, 2009.
- ARDYANI, T. et al. Surfactants with aromatic headgroups for optimizing properties of graphene/natural rubber latex composites (NRL): Surfactants with aromatic amine polar heads. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 545, p. 184–194, jun. 2019.
- ARGYO, C. et al. Multifunctional mesoporous silica nanoparticles as a universal platform for drug delivery. **Chemistry of Materials**, v. 26, n. 1, p. 435–451, 2014.
- AYCHE, K. et al. Natural rubber based thin coating for MEMS encapsulation. **Progress in Organic Coatings**, v. 99, p. 308–313, 2016.
- AZAMMI, A. M. N. et al. Conceptual design of automobile engine rubber mounting composite using TRIZ-Morphological chart-analytic network process technique. **Defence Technology**, v. 14, n. 4, p. 268–277, 2018.
- BADLEY, R. D. et al. Surface modification of colloidal silica. **Langmuir**, v. 6, n. 4, p. 792–801, abr. 1990.
- BLACKLEY, D. C. **Polymer Latices**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997.
- BOKOBZA, L. Natural Rubber Nanocomposites: A Review. **Nanomaterials**, v. 9, n. 1, p. 12, 22 dez. 2018.
- BURNS, A.; OW, H.; WIESNER, U. Fluorescent core–shell silica nanoparticles: towards “Lab on a Particle” architectures for nanobiotechnology. **Chem. Soc. Rev.**, v. 35, n. 11, p. 1028–1042, 2006.
- CABRERA, F. C. et al. Organic acids and protein compounds causing the photoluminescence properties of natural rubber membranes and the quenching phenomena from Au nanoparticle incorporation. **Luminescence**, v. 29, n. 8, p. 1047–1052, 2014.
- CAO, L. et al. Positive-Charge Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles as Nanocarriers for Controlled 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid Sodium Salt Release. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 26, p. 6594–6603, 2018.
- CAPELETTI, L. B. et al. Tailored Silica–Antibiotic Nanoparticles: Overcoming Bacterial Resistance with Low Cytotoxicity. **Langmuir**, v. 30, n. 25, p. 7456–7464, 18 jul. 2014.
- CESAR, M. B. et al. Development and Characterization of Natural Rubber Latex and

Polylactic Acid Membranes for Biomedical Application. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, n. 1, p. 220–230, 31 jan. 2020.

CHAN, A. J. et al. Natural Rubber-Filler Interactions: What Are the Parameters? **Langmuir**, v. 31, n. 45, p. 12437–12446, 2015.

CHEN, X.; QIU, T. Natural rubber composites reinforced with basic magnesium oxysulfate whiskers : Processing and ultraviolet resistance / flame retardant properties. **Polymer Testing**, v. 81, n. November 2019, p. 106271, 2020.

CHENG, C. X. et al. Porous Polymer Films and Honeycomb Structures Based on Amphiphilic Dendronized Block Copolymers. **Langmuir**, v. 21, n. 14, p. 6576–6581, jul. 2005.

CORNELL, S. W.; KOENIG, J. L. Raman Spectra of Polyisoprene Rubbers. **Macromolecules**, v. 2, n. 5, p. 546–549, set. 1969.

DANNA, C. S. et al. Flexible fluorescent films based on quantum dots (QDs) and natural rubber. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 43, p. 2–11, 2017.

DE OLIVEIRA, L. F. et al. Functionalized Silica Nanoparticles As an Alternative Platform for Targeted Drug-Delivery of Water Insoluble Drugs. **Langmuir**, v. 32, n. 13, p. 3217–3225, 5 abr. 2016.

DING, H. L. et al. Fe₃O₄@SiO₂ Core/Shell Nanoparticles: The Silica Coating Regulations with a Single Core for Different Core Sizes and Shell Thicknesses. **Chemistry of Materials**, v. 24, n. 23, p. 4572–4580, 11 dez. 2012.

DO NASCIMENTO, R. M. et al. Towards the production of natural rubber-calcium phosphate hybrid for applications as bioactive coatings. **Materials Science and Engineering C**, v. 94, n. December 2017, p. 417–425, 2019a.

DO NASCIMENTO, R. M. et al. Optimized-Surface Wettability: A New Experimental 3D Modeling Approach Predicting Favorable Biomaterial–Cell Interactions. **Advanced Theory and Simulations**, v. 2, n. 7, p. 1900079, 14 jul. 2019b.

DO NASCIMENTO, R. M. et al. Blood droplets on functionalized surfaces: Chemical, roughness and superhydrophobic effects. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 574, n. March, p. 188–196, ago. 2019c.

ELLEFSSEN, K. L. et al. Applications of FLIKA, a Python-based image processing and analysis platform, for studying local events of cellular calcium signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1866, n. 7, p. 1171–1179, jul. 2019.

FERRARI, E.; FABBRI, P.; PILATI, F. Solvent and substrate contributions to the formation of breath figure patterns in polystyrene films. **Langmuir**, v. 27, n. 5, p. 1874–1881, 2011.

FLORIANO, J. F. et al. Biocompatibility studies of natural rubber latex from different tree clones and collection methods. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 2, p. 461–470, 8 fev. 2014.

GAO, J.; HE, Y.; GONG, X. Effect of electric field induced alignment and dispersion of functionalized carbon nanotubes on properties of natural rubber. **Results in Physics**, v. 9, p. 493–499, 2018.

GEORGE, G. et al. Thermally conductive thin films derived from defect free graphene-natural rubber latex nanocomposite: Preparation and properties. **Carbon**, v. 119, p. 527–534, 2017.

GUO, H. et al. Enhanced fatigue and durability of carbon black/natural rubber composites reinforced with graphene oxide and carbon nanotubes. **Engineering Fracture Mechanics**, v. 223, n. November 2019, p. 106764, 2020.

HENDRA, P. J.; JACKSON, K. D. O. Applications of Raman spectroscopy to the analysis of natural rubber. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 50, n. 11, p. 1987–1997, 1994.

HO, C. C. et al. Surface Structure of Natural Rubber Latex Particles from Electrophoretic Mobility Data. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 178, n. 2, p. 442–445, mar. 1996.

HO, C. C.; NG, W. L. Surface study on the rubber particles in pretreated Hevea latex system. **Colloid and Polymer Science Kolloid-Zeitschrift & Zeitschrift für Polymere**, v. 257, n. 4, p. 406–412, 1979.

JEELANI, P. G. et al. Multifaceted Application of Silica Nanoparticles. A Review. **Silicon**, 31 jul. 2019.

KAWAHARA, S. et al. Characterization of fatty acids linked to natural rubber - Role of linked fatty acids on crystallization of the rubber. **Polymer**, v. 41, n. 20, p. 7483–7488, 2000.
KINOSHITA, M. et al. Biocomposites composed of natural rubber latex and cartilage tissue derived from human mesenchymal stem cells. **Materials Today Chemistry**, v. 12, p. 315–323, 2019.

LEE, D. H. et al. Superhydrophobic surfaces with near-zero sliding angles realized from solvent relative permittivity mediated silica nanoparticle aggregation. **J. Mater. Chem. A**, v. 2, n. 40, p. 17165–17173, 2014.

LU, H.-T. Synthesis and characterization of amino-functionalized silica nanoparticles. **Colloid Journal**, v. 75, n. 3, p. 311–318, 8 maio 2013.

MARCELO, R. et al. Surface Wettability of a Natural Rubber Composite under 2 Stretching: A Model to Predict Cell Survival 1. 2021.

MEDUPIN, R. O. et al. Carbon Nanotube Reinforced Natural Rubber Nanocomposite for Anthropomorphic Prosthetic Foot Purpose. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 20146, 27 dez. 2019.

NAKANISHI, E. Y. et al. Latex and rosin films as alternative waterproofing coatings for 3-layer sugarcane-bamboo-based particleboards. **Polymer Testing**, v. 75, n. February, p. 284–290, 2019.

NALLASAMY, P.; MOHAN, S. Vibrational Spectra of cis-1,4-Polyisoprene. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 29, n. 1 PART A, p. 17–26, 2004.

NASCIMENTO, R. M. et al. Production and characterization of natural rubber-Ca/P blends for biomedical purposes. **Materials Science and Engineering C**, v. 39, n. 1, p. 29–34, 2014.

NAWAMAWAT, K. et al. Surface nanostructure of Hevea brasiliensis natural rubber latex particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 390, n. 1–3, p. 157–166, out. 2011.

NIAMLANG, S. et al. ScienceDirect The electromechanical response of titanium dioxide / natural rubber composite. **Materials Today: Proceedings**, v. 4, n. 5, p. 6267–6273, 2017.

NUN-ANAN, P. et al. Novel approach to determine non-rubber content in Hevea brasiliensis: Influence of clone variation on properties of un-vulcanized natural rubber. **Industrial Crops and Products**, v. 118, n. March, p. 38–47, 2018.

OGUNSONA, E. O.; MISRA, M.; MOHANTY, A. K. Influence of epoxidized natural rubber on the phase structure and toughening behavior of biocarbon reinforced nylon 6 biocomposites. **RSC Advances**, v. 7, n. 15, p. 8727–8739, 2017.

ON, N. K. et al. Thermal and mechanical behavior of natural rubber latex-silica aerogel film. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, n. 4, p. 3108–3116, 15 maio 2012.

OW, H. et al. Bright and Stable Core–Shell Fluorescent Silica Nanoparticles. **Nano Letters**, v. 5, n. 1, p. 113–117, jan. 2005.

OWENS, D. K.; WENDT, R. C. Estimation of the surface free energy of polymers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 13, n. 8, p. 1741–1747, ago. 1969.

PAULA, A. J. et al. Towards long-term colloidal stability of silica-based nanocarriers for hydrophobic molecules: beyond the Stöber method. **Chem. Commun.**, v. 48, n. 4, p. 591–593, 2012.

PAULA, A. J.; HWANG, G.; KOO, H. Dynamics of bacterial population growth in biofilms resemble spatial and structural aspects of urbanization. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1354, 13 dez. 2020.

PRASERTSRI, S. et al. Raman spectroscopy and thermal analysis of gum and silica-filled NR/SBR blends prepared from latex system. **Polymer Testing**, v. 32, n. 5, p. 852–861, ago. 2013.

PRASERTSRI, S.; RATTANASOM, N. Mechanical and damping properties of silica/natural rubber composites prepared from latex system. **Polymer Testing**, v. 30, n. 5, p. 515–526, 15 ago. 2011.

REN, Z. et al. Dual-Targeting Approach Degrades Biofilm Matrix and Enhances Bacterial Killing. **Journal of Dental Research**, v. 98, n. 3, p. 322–330, 24 mar. 2019.

RIYAJAN, S. A.; SANTIPANUSOPON, S. Influence of ammonia concentration and storage

period on properties field NR latex and skim coagulation. **KGK Kautschuk Gummi Kunststoffe**, v. 63, n. 6, p. 240–245, 2010.

ROCHETTE, C. N. et al. Shell structure of natural rubber particles: Evidence of chemical stratification by electrokinetics and cryo-TEM. **Langmuir**, v. 29, n. 47, p. 14655–14665, 2013.

SAHOO, B. et al. Facile preparation of multifunctional hollow silica nanoparticles and their cancer specific targeting effect. **Biomaterials Science**, v. 1, n. 6, p. 647–657, 2013.

SAKDAPIPANICH, J. et al. Influence of mixed layer of proteins and phospholipids on the unique film formation behavior of Hevea natural rubber latex. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 466, p. 100–106, 2015.

SHAHRIL, D. A.; AZAMMI, A. M. N.; ZULFADLI, S. M. Reinforcement of kenaf fiber in natural rubber composite for automotive engine rubber mounting. **International Journal of Applied Engineering Research**, v. 12, n. 24, p. 14490–14494, 2017.

SONG, X. et al. Synthesis of Fluorescent Silica Nanoparticles and Their Applications as Fluorescence Probes. **Journal of Fluorescence**, v. 21, n. 3, p. 1205–1212, 8 maio 2011.

STÖBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 26, n. 1, p. 62–69, jan. 1968.

SUKHAWIPAT, N. et al. A new hybrid waterborne polyurethane coating synthesized from natural rubber and rubber seed oil with grafted acrylate. **Progress in Organic Coatings**, v. 141, n. September 2019, p. 105554, 2020.

SUTTEEWONG, T. et al. PMMA particles coated with chitosan-silver nanoparticles as a dual antibacterial modifier for natural rubber latex films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 174, n. November 2018, p. 544–552, 2019.

TANAKA, Y. Structural Characterization of Natural Polyisoprenes: Solve the Mystery of Natural Rubber Based on Structural Study. **Rubber Chemistry and Technology**, v. 74, n. 3, p. 355–375, 2001.

TARACHIWIN, L. et al. Structural characterization of α -terminal group of natural rubber. 2. Decomposition of branch-points by phospholipase and chemical treatments. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 4, p. 1858–1863, 2005.

THAPPILY, P.; MANDIN, P.; SAUVAGE, T. Charge transport properties of semiconducting natural rubber (Cis 1,4-polyisoprene). **Microelectronic Engineering**, v. 231, n. June, p. 111373, 2020.

TRAN, T. N. et al. Antibacterial activity of natural rubber based coatings containing a new guanidinium-monomer as active agent. **Progress in Organic Coatings**, v. 128, n. September 2018, p. 196–209, mar. 2019.

VAN BEILEN, J. B.; POIRIER, Y. Establishment of new crops for the production of natural rubber. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 522–529, nov. 2007.

VINCENT, B. et al. The stability of silica dispersions in ethanol/ cyclohexane mixtures. **Colloids and Surfaces**, v. 49, n. C, p. 121–132, 1990.

WADEESIRISAK, K. et al. Rubber particle proteins REF1 and SRPP1 interact differently with native lipids extracted from *Hevea brasiliensis* latex. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1859, n. 2, p. 201–210, 2017.

WAN, L.-S. et al. Multiple interfaces in self-assembled breath figures. **Chem. Commun.**, v. 50, n. 31, p. 4024–4039, 2014.

WIDAWSKI, G.; RAWISO, M.; FRANÇOIS, B. Self-organized honeycomb morphology of star-polymer polystyrene films. **Nature**, v. 369, n. 6479, p. 387–389, 25 jun. 1994.

XU, T. et al. Interfacial interaction between the epoxidized natural rubber and silica in natural rubber/silica composites. **Applied Surface Science**, v. 328, p. 306–313, fev. 2015.

YONG, M. Y.; ANG, D. T. C.; SARIH, N. M. Novel natural rubber-based epoxy coating. **Progress in Organic Coatings**, v. 135, n. May, p. 105–113, 2019.

ZHANG, G.; WANG, J. Preparation of novel flame-retardant organoclay and its application to natural rubber composites. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 115, n. December 2017, p. 137–147, 2018.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos para o estudo dos solos brasileiros oxissolo, ultissolo e TMI, abordados no capítulo 2, indicaram que o imageamento de raios X de campo amplo por meio da microscopia eletrônica de varredura e o processamento de imagens utilizados nesse trabalho, constituem uma abordagem avançada de imageamento no que diz respeito a avaliação completa de partículas de solos (em múltiplas escalas de comprimento). Visto que, através dessa abordagem analítica, uma “impressão digital” da morfologia e estrutura das partículas que formam um solo de alta fertilidade sustentada (Terra Mulata de Índio) é exemplificada por meio dessa aplicação. Abrindo novos horizontes para estudos futuros, no que tange a racionalidade de projetos de gerenciamento de solos, bem como o envelhecimento e deterioração mediante seu uso, o que acarreta na garantia da segurança alimentar num futuro próximo.

A borracha natural proveniente do látex da *Hevea brasiliensis* detentora de uma ampla gama de propriedades relevantes para o cenário científico e tecnológico foi estudada aqui por meio de duas pesquisas científicas. A primeira, relatada no capítulo 3, envolve a produção de revestimentos híbridos de BN e partículas de CaP bioativas. As técnicas de imageamento aplicadas nesse estudo, resultaram numa caracterização morfológica, estrutural, além da análise de estabilidade físico-química desses revestimentos sob fluido corporal simulado. Sendo importante mencionar também, que os híbridos analisados apresentaram propriedades de biocompatibilidade, estabilidade e biodegradabilidade em diferentes níveis (dependência temporal), o que fomenta a aplicação do sistema de revestimento BN-CaP em biomateriais para implantes, *scaffolds* e sistemas de liberação controlada de drogas.

Finalmente, a segunda pesquisa relatada aqui sobre a borracha natural, capítulo 4, exemplifica como o imageamento confocal e o processamento de imagens podem ser utilizados na caracterização *in situ* de filmes compósitos de BN e partículas de SiO₂ *core-shell* fluorescentes. Vale ressaltar, que as SiPs foram utilizadas nesse trabalho como sondas na investigação dos mecanismos associados com as propriedades física e química do polímero natural. Por meio do processamento dos dados 4D produzidos, ou seja, das pilhas de imagens resolvidas no tempo, foi possível rastrear a posição, a distância média entre partículas vizinhas e a intensidade do sinal das SiPs. Além disso, a estabilidade do sistema BN-SiPs foi evidenciada mesmo sob uma solução aquosa de alta resistência iônica (tampão PBS) como fluido em uma câmara de fluxo. Sendo assim, além das descobertas realizadas com a caracterização dos filmes compósitos, a abordagem de imageamento realizada nesse trabalho

representa um novo conceito para o estudo de revestimentos, sem que haja a necessidade de qualquer modificação das amostras, método no qual oferece valores práticos à pesquisa aplicada e desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- DO NASCIMENTO, R. M. et al. Towards the production of natural rubber-calcium phosphate hybrid for applications as bioactive coatings. **Materials Science and Engineering C**, v. 94, n. December 2017, p. 417–425, 2019.
- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Processamento digital de imagens**. 3. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2010.
- JOSHI, M. A. **DIGITAL IMAGE PROCESSING: An Algorithmic Approach**. 3. ed. Delhi: PHI Learning Private Limited, 2018.
- OLIVEIRA, N. C. et al. Morphological analysis of soil particles at multiple length-scale reveals nutrient stocks of Amazonian Anthrosols. **Geoderma**, v. 311, n. August 2017, p. 58–66, fev. 2018.
- PETRY, R. et al. Nanomaterials Properties of Environmental Interest and How to Assess Them. In: **Nanomaterials Applications for Environmental Matrices**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 45–105.
- TUCKER, J. The Historian, the Picture, and the Archive. **Isis**, v. 97, n. 1, p. 111–120, mar. 2006.
- WILLIAM, C. J. **Under the microscope: a brief history of microscopy**. Singapore: World Scientific Publishing Company, 2006. v. 5

APÊNDICE A – PROCESSAMENTO DE IMAGENS

Os mapas elementares brutos das imagens de campo amplo geradas inicialmente em escala de cinza (8 bits por canal) com uma definição de aproximadamente 10000 x 10000 (96 pixels por polegada), agrupados em 5000 x 5000 pixels, cortados em aproximadamente 4800 x 4800 pixels (para remover as bordas da imagem) e, em seguida, binarizadas com um limite de 0,1. Após o processo de binarização, os valores de contraste menores que 0,1 são convertidos para o valor de “0” (preto), representando assim a ausência do elemento naquele pixel, e os valores de contraste semelhantes ou maiores que 0,1 são convertidos para o valor de “1” (branco), representando a presença do elemento naquele pixel. Além disso, uma etapa média (ou seja, um filtro) foi aplicado duas vezes às imagens de raios X de campo amplo binarizadas (mapas elementares), através da qual o valor de contraste em cada pixel nas imagens foi mediado (média aritmética) com seus oito pixels vizinhos mais próximos (matriz 3x3). Para isso, gerou-se um script no programa *Wolfram Mathematica* que calcula a média dos valores de contraste dos pixels circundantes como em uma grade de caixa e depois ele foi aplicado para as matrizes de imagens binarizadas para reduzir os ruídos. O comando utilizado está descrito abaixo:

```
averages[m_] := With[{ker = BoxMatrix[1,3]},Divide@@ (ListCorrelate[ker, #, {2,-2},0]&/@{m,ConstantArray[1,Dimensions@m]})]
```

onde “BoxMatrix[1,3]” é o kernel para a convolução (ou correlação), neste caso uma matriz 3x3 ({{1,1,1},{1,1,1},{1,1,1}}). “Dimensions@m” dá a dimensão da matriz a partir da imagem binarizadas e “ConstantArray [1, Dimensions @ m]” gera uma matriz do mesmo tamanho da imagem binarizada, sendo todos os elementos iguais a 1. A função "ListCorrelate" gera a correlação do kernel *ker* com as matrizes da imagem binarizada e "ConstantArray [1, Dimensions @ m]", e neste caso, cada matriz acolchoada em cada extremidade com repetições de 0. Como resultado, a primeira correlação cria uma matriz em que cada elemento é a soma do valor de contraste do pixel correspondente (0 a 1; tons de cinza) com seus 8 vizinhos mais próximos em relação à matriz da imagem binarizadas e, a segunda correlação cria uma matriz com a mesma abordagem em relação à matriz “ConstantArray [1, Dimensions @ m]”. Por fim, a primeira matriz é dividida pela segunda através da função “Divide”, gerando assim a média aritmética de cada pixel com seus vizinhos mais próximos. Nesse sentido, o ruído foi reduzido progressivamente com o intuito

de aumentar a precisão durante a identificação de todas as partículas nas amostras de solo. Um exemplo de um mapa elementar cru (do carbono) correspondendo a área total varrida (8 x 8 mm) é dada como exemplo na Figura 2. Os mapas de campo amplo foram representados em preto (presença do elemento) e branco (ausência do elemento) em ordem para facilitar a visualização dos elementos, ver Figura 3. A porcentagem de distribuição de área de todos os elementos identificados, ver Tabela 2, foi obtida somando-se os valores de contraste (0 ou 1) de todos os pixels das imagens de campo amplo binarizadas e dividindo-os pela área total da imagem (~ 4800 x 4800 pixels).

As concentrações dos elementos identificados em todas as amostras de solo foram calculadas por duas abordagens. A primeira determinou a concentração através da soma dos valores de contraste de todos os pixels presentes nas imagens de campo amplo cruas (um exemplo de uma imagem de campo amplo crua para o elemento carbono está representada na Figura 2). Os valores de contraste foram dados em escala de cinza, com valores variando de 0 a 1 para cada pixel (8 bits/canal) e a concentração de cada elemento foi dada em contagens de intensidade, ver Figura 6. Esses cálculos foram realizados para pelo menos três mapas elementares de campo amplo adquiridos de pelo menos três amostras diferentes, resultando nos valores de média e desvio padrão mostrados na Figura 6.

Na segunda abordagem, as concentrações relativas dos elementos fornecidas em % em massa, ver Tabela 3, foram obtidas por EDS. O cálculo foi realizado pelo software AZtec por meio de um método padrão que correlaciona e normaliza as intensidades de pico considerando o peso da linha (ou seja, a probabilidade de cada transição de elétron ocorrer), a seção transversal de ionização para cada elemento (ou seja, a probabilidade de ionizar a camada interna) e a absorção de raio X e fluorescência. Além disso, a concentração molar relativa normalizada (CN, em unidades molares) para cada elemento foi calculada pela divisão do valor de % em massa (fornecido pelo AZtec) pela massa atômica (g mol^{-1}) de cada elemento e em seguida, normalizando-a ainda mais através da menor concentração molar relativa entre todos os elementos até 1,0.

Para determinar as funções de PSD, ver Figura 6, todas as partículas imageadas nos mapas elementares de campo amplo com tamanhos (ou seja, áreas) iguais ou maiores que 1 pixel (~ $2,5 \mu\text{m}^2$) foram identificadas nas imagens de campo amplo binarizadas. Para isso, em cada imagem aplicou-se a função “MorphologicalComponents” no Wolfram Mathematica. Esta função fornece uma matriz na qual cada pixel de valor equivalente a 1 nas imagens binarizadas é substituído por um índice inteiro. Então, todos os pixels 1 da primeira partícula identificada permanecem sendo 1, todos os pixels da segunda partícula identificada são

substituídos por 2, todos os pixels da terceira por 3, e assim por diante. Depois, aplica-se a essa matriz a função “ComponentMeasurements” com a propriedade “Area”, esta propriedade dá a área aproximada de cada partícula, onde cada área de pixel é ponderada por suas características vizinhas. Os valores de área são dados em pixel, assim os tamanhos equivalentes (áreas reais) das partículas identificadas foram determinados em μm^2 através de uma multiplicação simples (1 pixel $\sim 2.5 \mu\text{m}^2$). Os histogramas foram então gerados organizando estes valores de área para cada amostra em valores de $10 \mu\text{m}^2$. Este cálculo foi realizado para pelo menos três mapas elementares adquiridos de pelo menos três amostras diferentes, resultando nos valores de média e desvio padrão mostrados na Figura 6. Para a obtenção de informações morfológicas quantitativas precisas em escalas abaixo de $2,5 \mu\text{m}^2$, devem ser utilizadas altas magnificações e tempo de permanência do feixe mais longo nas varreduras individuais. Como o interessante aqui era revelar a morfologia de partículas grandes (da ordem de micrômetros) e adquirir uma alta amostragem de partículas, as escalas escolhidas de $2,5 (1 \times 1)$ a $\sim 59000000 \mu\text{m}^2 (4800 \times 4800)$ pixels) foram apropriadas. Finalmente, a distância média (em micrômetros) entre duas partículas vizinhas próximas foi obtida medindo-se a distância Euclidiana entre dois pontos em relação aos centroides de ambas as partículas. Para isto, utilizou-se a função "ComponentMeasurements" com a propriedade "Centroid" para obter o centroide de cada partícula da imagem. Em seguida, utilizou-se a função “Nearest” para encontrar as coordenadas mais próximas para cada coordenada de cada partícula. Então, utilizou-se a função “EuclideanDistance” para calcular a distância para cada par de coordenadas. Uma multiplicação pelo comprimento real de um pixel foi realizada para obter a distância em micrômetros. Finalmente, calculou-se a média usando a função “Mean”. Esta medida foi realizada para todas as partículas identificadas em cada imagem de campo amplo. A partir das varreduras de campo amplo realizadas em no mínimo três vezes para cada amostra, sendo possível calcular o desvio padrão na análise das partículas vizinhas, ver Tabela 4.