# UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATA DA SILVA



CURITIBA 2014 **RENATA DA SILVA** 

# SÍNTESE DE CELULOSE ENXERTADA COM POLIETILENOGLICOL E DESENVOLVIMENTO DE FILMES

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química, no Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr.Rilton Alves de Freitas Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra Maria Rita Sierakowski Físico-química

CURITIBA 2014

#### Catalogação na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S586s	Silva, Renata da Síntese de celulose enxertada com polietilenoglicol e desenvolvimento de filmes [recurso eletrônico] / Renata da Silva. – Curitiba, 2014.
	Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós- Graduação em Química, 2014.
	Orientador: Rilton Alves de Freitas. Coorientador: Maria Rita Sierakowski.
	1. Celulose. 2. Polietilenoglicol. 3. Filmes finos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Freitas, Rilton Alves de. III. Sierakowski, Maria Rita. IV.Título.
	CDD: 572.56682

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928

TERMO DE APROVAÇÃO

# SINTESE DE CELULOSE ENXERTADA COM POLIETILENOGLICOL E DESENVOLVIMENTO DE FILMES

por

#### Renata da Silva

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:

Killon (Als di

Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas Dep. de Química – UFPR

Prof/Dr. Guilherme Mariz de Oliveira Barra Dep. de Química – UFSC

awa

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>d</sup> Sônia Faria Zawadzki Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 21 de março de 2014.

Dedico este trabalho a todas as pessoas que acreditaram em mim, em especial aos meus pais, pelo amor e paciência.

À Deus, pelo presente.

À minha amiga incondicional Belisa.

Ao Professor Rilton pela confiança e serenidade nos períodos mais conturbados.

#### AGRADECIMENTOS

À Deus, por abrir tantas portas, pelas curvas da minha vida.

Ao meu pai, pelo amor, pela paciência, mesmo que pequena você não teve saída né.

À minha mãe, pelo esforço em tentar compreender o meu mundo, pelo apoio, amor e confiança.

À minha madrinha por acreditar em mim.

Ao Marcos por sempre me apoiar e acreditar em mim.

As minhas amigas Regiane, Lyslaine e Bêlisa, que estiveram presentes nos momentos mais difíceis.

Ao Professor Doutor Rilton Alves de Freitas, exemplo de profissional e pessoa, obrigada pela confiança depositada em mim, pelo incentivo, pela orientação, paciência e dedicação.

À Professora Doutora Maria Rita Sierakowski por abrir as portas do laboratório e me acolher, pela sua generosidade, orientação e contribuição científica.

À Professora Doutora Neoli Lucyszyn, pela credibilidade, por me indicar ao Prof. Rilton.

Aos Professores, Doutora Sônia Faria Zawadzki e Doutor Guilherme Mariz de Oliveira Barra por aceitarem fazer parte da minha banca e contribuírem em meu trabalho.

À Membracel® Produtos Tecnológicos Ltda por fornecer as aparas de celulose bacteriana utilizadas neste trabalho.

À Professora Doutora Graciela I. B. de Muniz, a MSc. Daniele Cristina Potulski e a MSc. Eliane Lopes da Silva do Departamento de Engenharia Florestal da UFPR por permitir, e auxiliarem na utilização do moinho Supermasscolloider para o processamento das aparas de celulose bacteriana.

Ao Professor Doutor José Manuel dos Reis Neto, e a Elisiane R. Pescini do LAMIR – UFPR por permitir, e terem ajudado nas análises de granulometria a laser.

Ao Professor Doutor Roberto Pontarolo pelo acesso e uso do infravermelho com transformada de fourier (FTIR).

À Professora Doutora Tânia Mari Bellé Bresolinpelas análises termogravimétricas.

Ao Professor Doutor Edvani Curti Muniz pelas análises de RMN em estado sólido.

Ao Professor Doutor Miguel Daniel Nozeda pelas discussões e análise de RMN de hidrogênio.

Ao Doutorando Cleverton Pirich, não somente pelas imagens de AFM, mas por me acolher no laboratório, uma pessoa admirável pela sua solidariedade, obrigada pelos cafés, pelos desabafos e pela amizade.

Aos Doutorandos Guilherme Fadel Pichet e Marco Aurélio Woehl, pelas contribuições e discussões nos primeiros meses de vida do meu projeto.

À aluna de iniciação cientifica Helen Bassani por contribuir nas análises de colorimetria.

Ao Professor Doutor Irineu Mazzaro do Departamento de Física por disponibilizar o equipamento de Difração de raios- X

À amiga Enriqueta, por me mostrar horizontes.

À Carol pela amizade, parceira de garfo e psicologia, muito obrigada por vivenciar comigo e me ouvir nos momentos mais importantes do mestrado.

Aos colegas e amigos do Biopol, Andressa, Carol, Vivian, Marco, Francine, Cleverton, Guilherme, Gabriel, Amid, Helen e Clayton que de alguma forma contribuíram cientificamente, ou não, obrigada pelos cafés, conversas, choros, risadas e por aguentar minha cantoria.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR e a todos os demais colaboradores do Programa.

À CAPES e ao programa REUNI, e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

"Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos"

Friedrich Nietzche

#### RESUMO

Dispositivos biomédicos podem promover processos indesejáveis de adesão e formação de trombos, quando em contato com células ou proteínas. A fim de minimizar esta problemática, muitos estudos estão em desenvolvimento visando a produção de filmes finos nanoestruturados capazes de revestir tais dispositivos implantáveis, sendo o filme então uma interface antiaderente entre o dispositivo e a célula. Este trabalho consiste em enxertar o polietilenoglicol (PEG) em nanocelulose bacteriana (NCB) por meio da reação de peguilação e produzir filmes com propriedades hidrofílicas. Foram produzidas 6 amostras com PEG de massa molar 200 g.mol<sup>-1</sup>, 300 g.mol<sup>-1</sup> e 400 g.mol<sup>-1</sup>, com proporções de substiuição teóricas de 1:1 e 1:2. O produto da reação NCBm-PEG, foi confirmado por espectroscopia de Resssonância Magnética Nuclear de estado sólido (RMN). Foram realizadas análises termogravimétricas e de difração de raios-X (DRX), que demonstraram que houve diferença significativa na cristalinidade dos derivados NCBm-PEG em relação a NCBm, sugerindo assim degradação de regiões amorfas dos derivados peguilados. Na sequencia foram produzidos filmes por "sping-coating", para esses foi medido o ângulo de contato, bem como a energia livre de superfície. E pelos resultados, pode-se observar um aumento do componente polar, bem como redução do componente dispersivo, da energia livre de superfície, indicando que os filmes de NCBm-PEG apresentam-se mais hidrofílicos que o material inicial (NCB). Foi feita a deposição de fibronectina de plasma bovino sobre os filmes, e a topografia desses foi avaliada por microscopia de força atômica (AFM), cuja morfologia mostrou uma baixa adsorção da proteína em filmes de NCBm-PEG, em relação à NCB. Assim, os derivados de NCBm-PEG apresentam propriedades mais hidrofílicas e podem ser potenciais candidatos em sistemas implantáveis, impedindo o processo de adesão celular.

Palavras-chave: Celulose bacteriana, peguilação, filmes.

#### ABSTRACT

Biomedical devices may promote undesirable processes of adhesion and thrombus formation when in contact with cells or proteins. To minimize this problem, many studies are aimed at developing the production of nanostructured thin films capable of coating implantable devices, forming a nonstick interface between the device and the cell. In this work it was grafted polyethylene glycol (PEG) in bacterial nanocelulose (BNCm) through pegylation reaction and production of films with hydrophilic properties. It was generated 6 samples with PEG, with different molar ratio of 200 g.moL<sup>-1</sup>, 300 g.moL<sup>-1</sup> and 400 g.moL<sup>-1</sup>, with theoretical ratios of 1:1 and 1:2. The reaction product BNCm-PEG was confirmed by proton Nuclear Magnetic Resssonance (NMR) and solid state NMR. Thermogravimetric and X- ray diffraction (XRD) analyzes were performed, and demonstrated a significant difference in crystallinity of BNCm-PEG derivatives with respect to BNC, suggesting degradation of amorphous regions of BNCm-PEG grafted samples. After, the films were produced using sping-coating, and further was measured the contact angle and the surface free energy. As the results produced, can be observe an increase in the polar component, as well as reducing the dispersive component, of the surface free energy, indicating that the films of BNCm-PEG are more hydrophilic than the starting material (BNC). Deposition of bovine plasma fibronectin on the films, and the topographycal analysis using atomic force microscopy (AFM), showed a low adsorption of protein onto films of BNCm-PEG, compared to BNC. Thus, the BNCm-PEG derivatives exhibit a more hydrophilic properties and may be a potential candidates to coating implantable devices, preventing the process of cell adhesion.

Keywords: Bacterial Cellulose, pegylation, thin films.

# **LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1 - RESPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA UNIDADE DE REPETIÇÃO
DA CELULOSE, A CELOBIOSE
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA MOLECULAR
DA CELULOSE. APRESENTANDO A EXTREMIDADE REDUTORA
E NÃO REDUTORA19
FIGURA 3 - MICROGRAFIA DA CELULOSE BACTERIANA OBTIDA POR
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO
IDENTIFICANDO AS MICROFIBRILAS
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA CELULOSE
BACTERIANA, DE SUA SINTESE E FORMAÇÃO DAS FIBRILAS
ELEMENTARES E MICROFIBRILAS
FIGURA 5 - MODELO ESQUEMÁTICO PROPOSTO PARA O REARRANJO
MOLECULAR DAS CADEIA DE CELULOSE TIPO I PARA
CELULOSE TIPO II OU MERCERIZADA, UTILIZANDO HIDRÓXIDO
DE SÓDIO22
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO POLIETILENOGLICOL27
FIGURA 7 - ANÁLISE GRANULOMÉTRICA E TOPOGRAFICA DE NCB
FIGURA 8 - ESQUEMA REACIONAL DA HALOGENAÇÃO DO PEG, UTILIZANDO
O REAGENTE DE LUCAS (HCL/ZNCL <sub>2</sub> )
FIGURA 9 - ILUSTRAÇÃO DA REAÇÃO DE SÍNTESE DO PEG COM CELULOSE39
FIGURA 10 - ESPECTRO DE 1H-RMN PARA AMOSTRA DE CELULOSE
BACTERIANA PEGUILADA NCBM-PEG 200 1:1. SOLVENTE
DMSO/LICL À 70 °C. REALIZADA EM ESPECTROMETRO
BRUKER 400 MHZ40
FIGURA 11 - ESPECTROS DE <sup>13</sup> C-RMN EM ESTADO SÓLIDO DAS AMOSTRAS
DE NCBM, NCBM-PEGS42
FIGURA 12 – ESPECTROS DE <sup>13</sup> C -RMN EM ESTADO SÓLIDO DAS AMOSTRAS
DE NCB MERCERIZADA E NCBM-PEG 200 1:143
FIGURA 13 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X PARA AS AMOSTRAS DE NCBM E
NCBM-PEG45

- FIGURA 17 IMAGENS DOS PERFIS DE GOTAS, SOBRE OS FILMES DE NCBM E NCBM-PEG DEPOSITADOS EM MICA, USANDO COMO SOLVENTE ÁGUA PURIFICADA. DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO EM EQUIPAMENTO TENSIÔMETRO DATAPHYSICS OCA15, VOLUME DE 3 ML DE ÁGUA......50

- FIGURA 21 IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DAS AMOSTRAS DE NCBM E NCBM-PEG COM OU SEM FIBRONECTINA DEPOSITADA. UTILIZANDO MICA COMO

FIGURA 22 – REPRESENTAÇÃO EQUEMÁTICA DA ADSORÇÃO DA FIBRONECTINA SOBRE OS FILMES DE NCBM E NCBM-PEG....58

# LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ATRIBUIÇÃO DOS DESLOCAMENTOS DE <sup>13</sup> C-RMN EM ESTADO
SÓLIDO PARA AS AMOSTRAS DE NCBM E NCBM-PEGS42
TABELA 2 - INDICE DE CRISTALINIDADE (IC) DA NCBM-PEG 200, NCBM-PEG
300 E NCBM-PEG 400 UTILIZANDO RESULTADOS OBTIDOS
POR DRX E <sup>13</sup> C-RMN46
TABELA 3 - DADOS DE ANALISE TERMOGRAVIMETRICA PARA AS AMOSTRAS
DE NCBM E NCBM-PEG 200, NCBM-PEG 300 E NCBM-PEG 400
TABELA 4-DADOS DA QUANTIFICAÇÃO COLORIMÉTRIA DE
POLIETILENOGLICOL NAS AMOSTRAS
TABELA 5 - DADOS DE ENERGIA LIVRE DE SUPERFÍCIE DETERMINADOS
PELO MÉTODO DE WU PARA AS AMOSTRAS DE NCBM E
NCBM-PEGS55
TABELA 6- ANÁLISE DE XPS DOS FILMES DE NCBM E NCBM-PEG 400
REVESTIDOS COM FIBRONECTINA

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CB: Celulose bacteriana
- DTR: desaminotirosil-tirosina
- DMSO: dimetilsufóxido
- DRX: Difração de raios X
- FTIR: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
- CB-Mercerizada: Celulose mercerizada
- MFA (AFM): microscopia de força atômica (Atomic Force Microscopy)
- NCB : nanocelulose bacteriana

-NCBm: nanocelulose bacteriana mercerizada

- PEG: polietilenoglicol
- PEG-CI: PEG halogenado com cloro

- NCBm-PEG 200 1:1. Celulose peguilada com PEG 200 em proporção substituição teórica NCBm: PEG de 1:1

- NCBm-PEG 200 1:2. Celulose peguilada com PEG 200, em proporção substituição teórica NCBm:PEG de 1:2

- NCBm-PEG 300 1:1. Celulose peguilada com PEG 300, em proporção substituição teórica NCBm-PEG de 1:1

- NCBm-PEG 300 1:2. Celulose peguilada com PEG 300, em proporção substituição teórica NCBm:PEG de 1:2

- NCBm-PEG 400 1:1. Celulose peguilada com PEG 400, em proporção substituição teórica NCBm:PEG de 1:1

- NCBm-PEG 400 1:2. Celulose peguilada com PEG 400, em proporção substituição teórica NCBm:PEG de 1:2

- PEI: polietilenoimina

- PU: poliuretano
- PTFE: tetrafluoretileno
- RMN: Ressonância magnética nuclear
- TEMPO: 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinil-oxi
- TG: análise termogravimétrica
- dTG: 1ª derivada da análise termogravimétrica

- TRIS: 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

# SUMARIO

1 INT	ſRODUÇÃO1	5
1.1	OBJETIVOS1	7
1.1.1	OBJETIVO GERAL	7
2 RE	VISÃO BIBLIOGRÁFICA1	8
2.1	CELULOSE BACTERIANA1	8
2.2	USOS DA CELULOSE EM APLICAÇÕES BIOMÉDICAS2	3
2.3	MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE CELULOSE2	4
3 MA	TERIAL E MÉTODOS2	9
3.1	LISTA DE REAGENTES2	9
3.2	OBTENÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA E DOS PRODUTO	S
PEGL	JILADOS2	9
3.2.1	OBTENÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA E OTIMIZAÇÃO D	A
REAÇ	ÇÃO2	9
3.2.2	CARACTERIZAÇÃO DA CELULOSE PROCESSADA EM MOINHO	0
3.2.3	REAÇÃO DE PEGUILAÇÃO DA NANOCELULOSE	1
3.2.4	CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE PEGUILAÇÃO3	1
3.2.5	DIFRATOMETRIA DE RAIOS X	2
3.2.6	TERMOGRAVIMETRIA (TG) E CALORIMETRIA EXPLORATÓRI	A
DIFEF	RENCIAL (DSC)	3
3.2.7	QUANTIFICAÇÃO DO RENDIMENTO DA PEGUILAÇÃO3	3
3.3	FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA DE CELULOS	Е
BACT	ERIANA E DOS FILMES ANTES E APÓS PEGUILAÇÃO	4
3.3.1	FORMAÇÃO DO FILME3	4
3.3.2	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)3	4
3.3.3	TENSIOMETRIA	5
3.3.4	ESPECTROSCOPIA FOTOELETRÔNICA DE RAIOS –X	5
4 RE	SULTADOS E DISCUSSÃO3	6
4.1	PROCESSAMENTO MECÂNICO DA CELULOSE BACTERIANA	6
4.2	SINTESE E CARACTERIZAÇÃO DA ENXERTIA DO POLIETILENOGLICO	L
EM C	ELULOSE	7

REFE	REFERENCIAS61				
5 CO	NSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	59			
4.7.3	ESPECTROSCOPIA FOTOELETRÔNICA DE RAIOS – X	58			
DEPC	OSITADA	56			
4.7.2	CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA DOS FILMES COM FIBRONECTI	NA			
4.7.1	CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA DOS FILMES	55			
4.7	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	55			
4.6	TENSIOMETRIA	49			
4.5	QUANTIFICAÇÃO DO RENDIMENTO DAS PEGUILAÇÕES	48			
4.4	ANÁLISES TERMOGRAVIMETRICAS	46			
4.3	ANÁLISE DA CRISTALINIDADE DAS AMOSTRAS DE NCB	43			

# 1 INTRODUÇÃO

A celulose bacteriana pertence a uma classe muito promissora de biopolímeros por apresentar uma membrana com estrutura nano-fibrilar distinta (CZAJA *et al.*, 2006). A membrana celulósica de origem bacteriana apresenta diversas aplicações clínicas, com resultados efetivos na redução do tempo de cicatrização tecidual e de contaminação por micro-organismos, gerando um menor custo no tratamento de feridas (SLEZAK *et al.*, 2004).

Entre as propriedades que tornam a celulose um candidato promissor como biomaterial, tem-se a bicompatibilidade, permitindo que a mesma seja aplicada em medicina humana e veterinária. Adicionalmente, além da sua elevada resistência mecânica no estado úmido, a permeabilidade aos líquidos e gases, e a baixa irritação, por exemplo, são propriedades que viabilizaram seu uso clínico (KLEMM *et al.*, 2001; CHARPENTIER *et al.*, 2006).

Uma outra possível aplicação, da celulose bacteriana, é em dispositivos implantáveis. Cita-se, como exemplo, o uso como vaso sanguíneo sintético, com propriedades similares a de outros produtos comerciais como Dacron® e politetrafluoroetileno, demonstrando assim a sua aplicabilidade (CZAJA *et al.*, 2006). Adicionalmente, microtubos de celulose que simulavam vasos sanguíneos foram testados em ratos, e em 4 semanas, apresentavam crescimento de novos tecidos no local, com ausência de resposta inflamatória (KLEMM *et al.*, 2001). São muitos os estudos que confirmam o potencial de crescimento de diferentes tipos de células em celulose bacteriana (KLEMM *et al.*, 2001; GRANDE *et al.*, 2009; FINK *et al.*, 2010; TORRES *et al.*, 2012; DE SOUZA *et al.*, 2013; PICHETH *et al.*, 2014). Tais estudos indicam que a celulose bacteriana possui interações com os diferentes modelos de células, e, desta forma, considera-se que a celulose possui a propriedade de permitir adesão celular sobre a sua superfície.

Entretanto, em alguns dos dispositivos supracitados, oriundos das inovações tecnológicas cirúrgicas, há necessidade de se obter materiais que ampliem o conceito de biocompatibilidade, em uma abordagem muito maior que a baixa toxicidade. Uma vez que o biomaterial estará em contato com uma complexidade tecidual (células e sangue), que constituem a região de inserção do implante, as interações entre o biomaterial e as células podem ser favoráveis ou não,

dependendo da aplicabilidade e dos resultados esperados após o procedimento cirúrgico. Assim, um primeiro fator que deve ser considerado no desenvolvimento de qualquer material ou dispositivo para aplicação biomédica, como exemplo os implantáveis biocompatíveis, é a interação da superfície do material com as células.

A interação entre biomaterial e células é importante em basicamente dois pontos: 1) No campo da engenharia de tecidos, por exemplo, a biocompatibilidade tem grande influência sobre o crescimento e desenvolvimento de novos tecidos, visto que a maioria das células, nos mamíferos, precisa interagir entre si, promovendo aderência, a fim de proliferar. 2) Em aplicações médicas de dispositivos implantáveis, não deve ocorrer a adesão celular sobre o dispositivo, como exemplo em implantes cardiovasculares, em que o acúmulo de plaquetas no interior da prótese pode ocasionar a formação de trombos, o que geralmente requer a remoção do dispositivo implantado (MARCOTTE; TABRIZIAN, 2008; FRANZ *et al.*, 2011).

Neste contexto de dispositivos implantáveis, a celulose bacteriana já foi avaliada em termos de hemocompatibilidade, através do estudo de tubos para enxertos vasculares, e verificou-se a indução de uma lenta cascata de coagulação (FINK *et al.*, 2010). A fim de minimizar a problemática apresentada, muitos estudos estão em desenvolvimento visando a produção de filmes finos nanoestruturados capazes de revestir tais dispositivos implantáveis, sendo o filme então uma interface antiaderente entre o dispositivo e a célula. Como exemplo, para o uso da celulose bacteriana é possível à modificação química de suas moléculas, o que pode melhorar os parâmetros de biocompatibilidade dos dispositivos implantáveis.

Com base no apresentado, um polímero que pode ser utilizado como coadjuvante, a fim de aumentar a hidrofilicidade da celulose é o polietilenoglicol (PEG). O PEG também possui grande aplicabilidade medicinal, já que apresenta propriedades bastante favoráveis para esse fim, tais como: baixa toxicidade, baixa imunogenicidade e elevado caráter hidrofílico (ZHANG *et al.*, 2002; BHATTARAI *et al.*, 2005; FEE; VAN ALSTINE, 2006). Assim, a proposta deste trabalho consiste em realizar a reação de enxerto de PEG em nanocelulose bacteriana (NCB), a fim de produzir biofilmes e avaliar a superfície dos mesmos, com a perspectiva de obter uma superfície mais hidrofílica em relação ao filme de material não modificado.

### 1.1 OBJETIVOS

#### 1.1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um biofilme, a partir de celulose bacteriana, com propriedades hidrofílicas através da modificação por peguilação.

# 1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter a NCBm (nanocelulose bacteriana mercerizada)
- Sintetizar NCBm enxertada com PEG;
- Caracterizar a NCBm e NCBm-PEG por métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (<sup>13</sup>C-RMN) hidrogênio (<sup>1</sup>H-RMN) e difração de raio-X (DRX);
- Realizar análise termogravimétrica e calorimétrica dos produtos NCBm-PEG;
- Quantificar o rendimento da peguilação;
- Obter os filmes de NCBm e NCBm-PEG por "spin-coating";
- Caracterizar os filmes obtidos antes e após o enxerto com PEG, através das técnicas: microscopia de força atômica (AFM) e tensiometria;
- Avaliar a adsorção de fibronectina sobre os filmes de NCBm e NCBm-PEGs, através das técnicas de espectroscopia fotoeletronica de raios- X (XPS) e AFM.

#### 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 CELULOSE BACTERIANA

A celulose bacteriana (CB) pode ser sintetizada a partir da bactéria *Gluconobacter xylinus*, a qual foi descrita pela primeira vez em 1886 por Brown. Difere da celulose vegetal no que diz respeito à cristalinidade elevada, aproximadamente 70 %, capacidade de absorção de água e estrutura reticular ultrafina (KLEMM *et al.*, 2001; KLEMM *et al.*, 2005). Além disso, a celulose extraída de vegetais exige um tratamento químico para a purificação, com o objetivo de eliminar a lignina e a hemicelulose. Já a celulose bacteriana é quimicamente pura e não necessita de tratamentos que possam vir a alterar as suas características estruturais. Ela pode absorver volumes de líquidos muito mais elevados, em relação à celulose de plantas (CZAJA *et al.*, 2006; GEA *et al.*, 2011).

A CB é um homopolissacarídeo insolúvel em água, formado por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) entre unidades de D-glucopiranose (FIGURA 1), cujas cadeias lineares são unidas por ligações de hidrogênio e por forças de van der Waals, formando estruturas supra-moleculares.



FIGURA 1 - RESPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA UNIDADE DE REPETIÇÃO DA CELULOSE, A CELOBIOSE FONTE: adaptado de Zugenmaier, 2001

Na molécula de celulose, cada unidade de D-glucopiranose contém três grupos hidroxila livres ligadas aos carbonos 2, 3 e 6 (C2, C-3 e C-6). Possui alcoóis secundários (C-2 e C-3) e álcool primário (C-6). Na cadeia de celulose os dois grupos terminais diferem entre si, pois a hidroxila presente no C-1 é um grupo resultante da formação do anel por uma ligação hemiacetal intramolecular, gerado pelo ataque nucleófilo de uma hidroxila ao grupo aldeído da cadeia aberta, possuindo, portanto, propriedades redutoras. Na outra extremidade da unidade de repetição da cadeia, o C-4, possuí hidroxila alcoólica, ou seja, não redutora (FIGURA 2).



Extremidade não redutora

Extremidade redutora

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA MOLECULAR DA CELULOSE. APRESENTANDO A EXTREMIDADE REDUTORA E NÃO REDUTORA FONTE: adaptada de Klemm, 1998a

A CB possui consistência de uma película gelatinosa e um aspecto translúcido, que se forma na superfície de culturas de bactérias *Gluconobacter*. Uma micrografia eletrônica de transmissão dessa película (FIGURA 3), revela-a formada por uma rede aleatória de microfibrilas de menos de 100 nm de diâmetro. Sua estrutura consiste em longas cadeias de celulose alinhadas paralelamente, entrepostas de regiões amorfas onde as cadeias não apresentam orientação definida (KOIZUMI *et al.*, 2008).



FIGURA 3 - MICROGRAFIA DA CELULOSE BACTERIANA OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO IDENTIFICANDO AS MICROFIBRILAS FONTE: IGUCHI *et al.* (2000)

Devido à abundante quantidade de hidroxilas disponíveis, a celulose possui fortes ligações intermoleculares e intramoleculares, fazendo com que a cadeia adote uma conformação linear rígida. Essas interações possibilitam que as cadeias se organizem formando blocos cristalinos, denominados fibrilas elementares.

As fibrilas de CB se combinam em cristalitos cuja seção transversal pode chegar a 12 nm. A síntese das microfibrilas envolve um complexo proteico denominado *complexo terminal* (TC), localizado na superfície externa da membrana celular da bactéria. Fileiras de até 60 TCs sintetizam cadeias de celulose que se agrupam em microfibrilas, que por sua vez formam feixes em forma de fita (FIGURA 4) com 80 x 4 nm e vários micrométros de comprimento (KOIZUMI *et al.*, 2008).

O crescimento dessas estruturas ocorre alternadamente em regiões cristalinas e regiões amorfas. A região amorfa dos feixes de microfibrilas ocupa quase 90 % de seu volume, entretanto contribui minimamente para a massa total de celulose, uma vez que absorve até 99 % da sua massa em água (KOIZUMI *et al.*, 2008). Nessas regiões, as moléculas encontram-se distribuídas ao acaso, proporcionando à celulose um caráter hidrofílico em sua superfície. Entretanto, no seu interior a celulose é hidrofóbica, fator que inviabiliza sua solubilidade em água (KLEMM *et al.*, 2005)



FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA CELULOSE BACTERIANA, DE SUA SINTESE E FORMAÇÃO DAS FIBRILAS ELEMENTARES E MICROFIBRILAS FONTE: adaptado de Iguchi *et . al.*, 2000

Considerando *G. xylinus,* o mecanismo de cristalização das microfibrilas pode dar origem a duas formas de celulose: a celulose tipo I, constituída por microfibrilas que se orientam de forma paralela e a celulose tipo II, composta por microfibrilas que se orientam de forma antiparalela (KLEMM *et al.*, 2005; CZAJA *et al.*, 2006). Entretanto, existem ainda mais dois tipos conformacionais de celulose. Ao tratar a celulose I com amônia obtém-se a celulose do tipo III, que por sua vez pode originar a celulose IV, após tratamento com glicerol, em altas temperaturas (ZUGENMAIER, 2001).

Devido às fortes ligações de hidrogênio presentes na estrutura da CB, há uma dificuldade de acesso dos reagentes, durante processos de modificação química da celulose, visto que as reações avançam da superfície para o interior das fibras(ROY *et al.*, 2009).Assim, geralmente faz-se necessário um tratamento prévio da celulose com NaOH, para facilitar a acessibilidade à CB. Esse processo é denominado mercerização, e já foi objeto de estudo de muitos autores, como Stepanova (1982); Isogai (1997) e Porro, *et al.* (2007). A mercerização ocorre geralmente em solução aquosa de NaOH, variando a concentração de 5 a 30 %, e a baixas temperaturas, para evitar degradação do polímero.

Kolpak, Weih e Blackwell (1998) demonstraram que a interação da celulose com o hidróxido de sódio aquoso está associada com a sua concentração, permitindo assim que a base penetre na estrutura cristalina de celulose, formando alcóxidos nas hidroxilas livres da CB, as quais incorporam os íons sódio. Esse procedimento confere a celulose, após sua regeneração, uma conformação do tipo II (FIGURA 5), formando um empacotamento antiparalelo, o qual permite que as ligações de hidrogênio se formem em maior extensão, resultando em arranjos tridimensionais, de menor energia e, portanto, mais estáveis (KOLPAK *et al.*, 1978; KROON-BATENBURG; KROON, 1997).



FIGURA 5 - MODELO ESQUEMÁTICO PROPOSTO PARA O REARRANJO MOLECULAR DAS CADEIA DE CELULOSE TIPO I PARA CELULOSE TIPO II OU MERCERIZADA, UTILIZANDO HIDRÓXIDO DE SÓDIO FONTE: adaptada de Shibazaki *et al.*, 1997

Assim, o acesso às hidroxilas da celulose para a realização de uma modificação química não é uma tarefa trivial, devido à complexidade do biopolímero, uma vez que a reação ocorre inicialmente nas regiões amorfas e progride para porções cristalinas. Como o processo de mercerização altera a conformação da celulose, bem como sua cristalinidade, também pode conferir uma maior acessibilidade às fibras, devido ao rompimento das ligações de hidrogênio.

## 2.2 USOS DA CELULOSE EM APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

A CB possui propriedades que favorecem seu uso em aplicações biomédicas, como capacidade de retenção de água, maior cristalinidade e maior resistência à tração, principalmente quando comparada com outros polímeros biodegradáveis naturais. Estas propriedades são fatores importantes na maioria dos casos, principalmente quando o polímero é utilizado como suporte na engenharia de tecidos (GRANDE *et al.*, 2009; ROY *et al.*, 2009)

Devido às propriedades já mencionadas, um número considerável de estudos com a celulose vem sendo realizados, direcionados para aplicações biomédicas. Como por exemplo, a utilização de CB comercialmente como curativos bioativos, em especial em queimaduras de segundo e terceiro grau, uma vez que as membranas atuam como acelerador no processo de re-epitelização (FONTANA *et al.*, 1990; CZAJA *et al.*, 2006). Ainda pode ser aplicada como substituta em microvasos sanguíneos e em enxertos com estrutura tridimensional para ossos e cartilagens (KLEMM *et al.*, 2001).

A CB e seus derivados já foram usados como modelo para deposição de hidroxiapatita, funcionando como um "andaime", um elemento estrutural, para engenharia de tecidos ósseos (HONG *et al.*, 2006; WAN *et al.*, 2007; GRANDE *et al.*, 2009; ZIMMERMANN *et al.*, 2011).

Vasos sanguíneos à base de CB foram testados em ratos, e foi observada a formação de vasos condutores artificiais estáveis e biocompatíveis. Além disso, a análise morfológica realizada mostrou que, na região de contato entre os vasos sanguíneos derivados de CB e o tecido, houve incorporação do biomaterial (KLEMM *et al.*, 2001; SCHUMANN *et al.*, 2009).

Usualmente, as superfícies de contato do biomaterial com o sangue podem ativar a coagulação e promover a formação de trombos, devido à interação da superfície com as proteínas presentes no sangue e as plaquetas. Para tanto, foram realizados teste de hemo-compatibilidade com enxertos vasculares baseados em CB e comparados com enxertos comerciais de poli (tereftalato de etileno) (PET) e poli (tetrafluoretileno) expandido (ePTEE). Foi observado que os enxertos baseados em CB induziram a uma lenta cascata de coagulação sanguínea, o que pode ser um problema no uso da CB em dispositivos médicos cardiovasculares, (FINK *et al.*, 2010). Por outro lado apesar das inúmeras vantagens apresentadas pela celulose, a adesão celular de elementos sanguíneos pode ser um problema para seu uso em dispositivos implantáveis. Assim, a hidrofilização da celulose pode ser uma estratégia capaz de melhorar ainda mais as excepcionais propriedades deste polímero.

# 2.3 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE CELULOSE

A celulose é em si um produto polimérico único e possuí vários atributos tais como a capacidade de absorver umidade, elevada resistência e durabilidade, uma elevada estabilidade térmica, boa biocompatibilidade, baixa densidade e um custo relativamente baixo. Entretanto, a celulose tem algumas desvantagens que incluem, a baixa solubilidade em solventes comuns e a adesão celular. Para ultrapassar estes inconvenientes, faz-se necessário promover modificações físicas e ou químicas da estrutura da celulose (ROY *et al.*, 2009).

A solubilidade da celulose é um fator importante na produção de filmes finos, pois exige a dissolução do polímero em um determinado solvente. Geralmente, solubiliza-se a celulose em alguns solventes como: *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (NMNO) (FREUDENBERG *et al.*, 2005; NOTLEY; WÅGBERG, 2005) ou solução aquosa NaOH/ tiouréia (YAN *et al.*, 2008).

Líquidos iônicos também são solventes promissores para a dissolução de celulose. Foram preparadas uma série de polietilenoglicóis (PEG)-funcionalizados com acetatos de alquilamônia ou cátion piperidínio, e foi verificado que os líquidos iônicos alquilamônio-PEG foram capazes de dissolver 8-12% em massa de celulose. As análises de difração de raios – X (DRX), indicaram uma nova conformação de celulose, com a conversão da celulose do tipo I para o tipo II e, consequentemente, a uma redução na cristalinidade (TANG *et al.*, 2012)

Assim, devido às perspectivas em ampliar a aplicação da celulose para uso clínico, modificações que possibilitem torná-la mais hidrofílica são relatadas. Como por exemplo, a modificação por oxidação com o reagente TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinil-oxi) (SAITO *et al.*, 2007; ISOGAI *et al.*, 2011) as hidroxilas primárias, presentes no C-6 da celulose são oxidadas à carboxilatos. O processo de oxidação pode ser controlado a partir do padrão de consumo de NaOH aquoso, que é continuamente adicionado à mistura reacional para manter o pH alcalino, de 9,0 a 10, durante a oxidação.

A oxidação com reagente TEMPO foi aplicada em celuloses nativas, como fios de algodão, celulose Kraft branqueada e CB. Mesmo sob condições de oxidação intensas ou para tempos de reação prolongados, quase nenhuma ou apenas pequenas quantidades de produtos solúveis em água foram obtidos. Análises revelaram que os grupos carboxilatos formados estavam predominantemente presente nas superfícies de fibrilas de celulose, e nenhuma oxidação ocorreu dentro de cristalitos de celulose. Entretanto, quando o mesmo procedimento é realizado em celuloses pré-tratadas por mercerização durante o branqueamento, tornaram-se transparentes e foram obtidos produtos oxidados solúveis em água. Assim, os grupos hidroxila primários, C-6 da celulose, podem ser inteiramente e seletivamente convertido em carboxilato de sódio, por oxidação mediada por TEMPO (ISOGAI *et al.*, 2011; PICHETH *et al.*, 2014)

As reações de trimetilsililação da celulose, e posterior solubilização em solventes orgânicos como tolueno ou clorofórmio, também são encontradas em literatura como possibilidades no uso de tal biopolímero (HOLMBERG *et al.*, 1997; KONTTURI *et al.*, 2003).

A utilização de reações de eterificação é outra forma de modificar quimicamente a estrutura da celulose. Derivados de celulose, como: éteres de metilcelulose, carboximetilcelulose e as celuloses hidroxialquiladas. Alguns ésteres e éteres de celulose são usados comercialmente, e tem aplicações potenciais em revestimentos, laminados, filmes ópticos, produtos farmacêuticos, alimentos e cosméticos (ROY *et al.*, 2009).

Após a solubilização da celulose, ou pela utilização de solventes adequados ou através de processos de modificação química da estrutura da celulose, a produção dos filmes finos pode ser feita com auxílio das técnicas de automontagem ou "layer-by-layer", com ou sem o auxílio da técnica de "sping-coating" (PICHETH *et al.*, 2014). Cita-se, como exemplo, o processo de oxidação da CB com radical TEMPO, com a formação de filmes ultrafinos, que foi investigada juntamente com a sua capacidade para adsorver polieletrólitos de cargas opostas, como a quitosana e alginato (PICHETH *et al.*, 2014).

Nos estudos supracitados, foi verificada a dificuldade do reagente em acessar as hidroxilas nas regiões internas do polímero, no que se refere à celulose nativa. Esse é um dos motivos pelo qual são observados poucos trabalhos de modificação química de celulose na literatura, ou os mesmos baseiam-se na utilização de derivados já disponíveis comercialmente. A maioria dos trabalhos estão voltados a tratamentos físicos de desfibrilação e adsorção com outros materiais poliméricos (ROY *et al.*, 2009).

Em uma busca realizada na literatura, localizou-se uma reação de síntese de celulose vegetal com PEG. Foi utilizado o processo de mercerização para realizar o enxerto de PEG 200 g.mol<sup>-1</sup> em celulose vegetal comercial, objetivando seu uso como um superdesintegrante em formulações farmacêuticas sólidas. O enxerto com PEG foi confirmado por ressonância magnética nuclear (RMN). Segundo o autor, o enxerto não aumentou a solubilidade da celulose em água. Entretanto, não foram analisadas para o produto de celulose vegetal-PEG os parâmetros físico-químicos da nova molécula, devido à finalidade, mais tecnológica, da sua aplicação (BHALEKAR *et al.*, 2010).

Apesar da solubilidade do produto gerado entre celulose e PEG permanecer a mesma do biopolímero de partida, no caso, a celulose vegetal (BHALEKAR *et al.*, 2010), a reação de enxerto de PEG na celulose tem potencial para ser um objeto de estudo, possibilitando avaliar outros parâmetros físicos e físico-químicos como: hidrofilicidade, cristalinidade e resistência mecânica. Podendo destinar o produto da reação para uma futura aplicação, bem como, a contribuição cientifica de um estudo de modificação química da celulose por enxerto com PEG.

O PEG, assim como a celulose, possui larga aplicabilidade clínica, em virtude da sua compatibilidade química, solubilidade em água e baixa toxicidade. Esses fatores possibilitam seu uso na liberação controlada de fármacos e em aplicações biomédicas (FRUIJTIER-PÖLLOTH, 2005; SAMSAMSHARIAT *et al.*, 2005; SCOTT *et al.*, 2008)

As reações que enxertam o PEG na estrutura de outra molécula são denominadas comumente de reações de peguilação. São muito importantes, na modificação de macromoléculas biológicas, peptídeos e proteínas, uma vez que, blindam epítopos antigênicos e materiais imunogênicos, protegendo a absorção mediada por receptor pelo sistema reticuloendotelial (RES), e impedindo o reconhecimento e degradação por enzimas proteolíticas (ROBERTS *et al.*, 2012).

O PEG apresenta-se como um poliéter de cadeia linear ou ramificada contendo grupos hidroxila nas suas extremidades (FIGURA 6), não contém carga e geralmente apresenta pouca reatividade.

HO-(CH2CH2O)n-CH2CH2OH

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO POLIETILENOGLICOL.

O PEG demonstra atividade antiaderente a algumas proteínas (AMIJI; PARK, 1992; LEE *et al.*, 2000; TZIAMPAZIS *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2003; SCOTT *et al.*, 2008), fator pelo qual é amplamente utilizado para desenvolver materiais com propriedades antiaderentes às células.

A fim de desenvolver um material biocompatível com o sistema hematológico, (LEE et al., 2000; KIM et al., 2003), desenvolveram alguns dispositivos biomédicos modificada polietilenoglicol (PEG) e com superfície com enxertos de poli(tetrafluoretileno) expandido (ePTFE), que encontram-se em uso clínico, como exemplo, em dispositivos cardiovasculares (LEE et al., 2000; SAMSAMSHARIAT et al., 2005; WIELAND et al., 2007). Adicionalmente, vários autores sugeriram o uso do PEG para diminuir a adesão superficial de plaquetas (AMIJI; PARK, 1992; TZIAMPAZIS et al., 2000; KIM et al., 2003; SCOTT et al., 2008), visto que o PEG tende a impedir a adesão celular quando a sua massa molar é inferior a 10.000 g.mol<sup>-1</sup> (LEE *et al.*, 2000). Assim, a massa molar e a concentração de PEG podem apresentar um efeito regulador sobre a adesão celular em biodispositivos implantáveis (TZIAMPAZIS et al., 2000).

Microcristais de celulose foram submetidos à carboxilação oxidativa, resultando em uma suspensão aquosa estabilizada, facilitando o acesso do PEG com um grupo amino terminal numa extremidade (PEG-NH<sub>2</sub>, M<sub>w</sub> = 1000g.mol<sup>-1</sup>). Os microcristais de celulose enxertados com PEG demonstraram uma melhora na estabilidade da dispersão dos mesmos (ARAKI *et al.*, 2000).

Com baseno apresentado, em que muitos estudos vêm sendo realizados a fim de desenvolver um material biocompatível com o sistema hematológico, e que ainda não foi produzido um material não-trombogênico universal, verifica-se a necessidade de desenvolver novos revestimentos biocompatíveis, que atendam à algumas condições, como: não serem tóxicos, não-trombogênico e não-imunogênico (FINK *et al.*, 2010).

Assim, a aplicabilidade da CB como dispositivo implantável na forma de filmes para o revestimento de biodispositivos é dependente de um aumento de sua hidrofilicidade, o que pode ser responsável por uma maior eficiência na antiadesão celular. Nesse contexto, o PEG e a CB são materiais que possuem propriedades promissoras para o uso em organismos vivos. No entanto, a CB, apesar de sua hidrofilicidade, apresenta boas propriedades em termos de adesão celular. Dessa forma, o PEG, que possui grupos funcionais na sua estrutura, como éter e álcool primário, e que possuem interações preferenciais com água, pode atuar como um agente hidrofílico, reduzindo a tendência à adesão celular. Neste trabalho, almeja-se que o enxerto de PEG à celulose, resulte em umproduto final com caráter mais hidrofílico. Até o momento, não foi localizado na literatura um estudo que enxerte o PEG por meio ligações covalente à CB, e avalie as propriedades físico-químicas dos filmes gerados.

#### 2.4 FIBRONECTINA

A fibronectina (FN) é uma proteína multifuncional amplamente distribuída em vários tecidos e fluidos corporais. Está envolvida em vários eventos biológicos, tais como a migração, diferenciação, proliferação e cancerização das células.

È comumente utilizada em teste de adsorção sobre superfícies implantáveis, já que quando em contato com o material implantado, além de ativar a coagulação do sangue e respostas inflamatórias, pode funcionar como mediadoras de adesão de células em superfícies sintéticas. A adesão celular às proteínas adsorvidas é particularmente importante na função das células, as respostas do hospedeiro aos implantes, e um design de substratos de engenharia de tecidos.

Assim, será depositado sobre a superfície dos filmes de NCBm e NCBm-PEGs, fibronectina de plasma bovino a fim de obter resultados prévios da adsorção da proteína com o filme de celulose mercerizada e celulose peguilada, serão investigados por XPS e AFM.

#### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### 3.1 LISTA DE REAGENTES

As membranas de CB secas foram doadas pela empresa Membracel® Produtos Tecnológicos Ltda., com sede em Almirante Tamandaré, PR.

Os PEGs 200, 300 e 400 g.mol<sup>-1</sup>, DMSO deuterado e *N*-óxido de *N*metilmorfolina, fibronectina de plasma bovino, KBr e diiodometano foram adquiridos da Sigma-AldrIch. Os demais reagentes como: ZnCl<sub>2</sub>, NaOH, HCl, azida sódica, foram de grau analítico. Polietilenimina (PEI), usada como substrato na produção de filmes, foi obtida comercialmente da Polymin® SNA. A água purificada utilizada foi obtida em sistema millipore (MilliQ system, Millipore).

# 3.2 OBTENÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA E DOS PRODUTOS PEGUILADOS

# 3.2.1 OBTENÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA E OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO

A obtenção da nanocelulose (NCB) foi baseada na metodologia proposta por Ilbrahim, El-Zawawy e Nassar (2012) e Pirich (2013).

As membranas de CB secas foram cortadas grosseiramente, com auxílio de uma tesoura, e logo após foram suspensas em água purificada (3g.L<sup>-1</sup>). A suspensão foi triturada com auxílio de um liquidificador (PHILIPS Walita) por 20 min. A amostra foi posteriormente processada em moinho Supermasscolloider (Masuko Sangyo MKCA6-2) com a colaboração da Prof. Dra. Graciela B. Munhoz do curso de Pós-Graduação em Eng. Florestal da UFPR, obtendo desta forma a CB processada mecanicamente. A partir desse processamento, a CB foi denominada de nanocelulose bacteriana (NCB). Em seguida, foi adicionado azida de sódio (200 mg.L<sup>-1</sup>) para conservação da suspensão, que foi mantida a 4 °C até a utilização.

### 3.2.2 CARACTERIZAÇÃO DA CELULOSE PROCESSADA EM MOINHO

Para determinação do tamanho médio e da distribuição granulométrica da NCB, foi empregada a análise por difração de raios laser, em granulômetro CILAS 1064, com a colaboração, LAMIR, UFPR. A suspensão de NCB foi diluída em água e submetida à ultrassom por 60s, e a varredura foi realizada de 1 a 100 µm. Esse ensaio permitiu a determinação granulométrica da frequência da distribuição de tamanho (d<sub>50%</sub>) baseado na difração de Fraunhofer, e na curva de distribuição de tamanho. A partir dos dados de diâmetros de partículas nos intervalos abaixo de 10, 50 e 90% da curva de distribuição de tamanho, foi obtido o índice de polidispersão (IP),

conforme equação 1.

$$\mathsf{IP} = \frac{d_{90\%} \cdot d_{10\%}}{d_{50\%}} \tag{1}$$

Em que: IP é o índice de polidispersão;  $d_{90\%}$  a frequência de tamanho de 90% das partículas (µm);  $d_{50\%}$  é a frequência de tamanho de 50% das partículas (µm) e  $d_{10\%}$  é a frequência de tamanho de 10% das partículas (µm).

#### 3.2.3 REAÇÃO DE PEGUILAÇÃO DA NANOCELULOSE

A reação de peguilação da nanocelulose foi baseada na metodologia de (BHALEKAR *et al.*, 2010), com modificações. Em um reator foram adicionados 7 g de PEG, e quantidade equivalente em mols de ácido clorídrico, utilizando como catalizador cloreto de zinco, seguido de aquecimento da mistura em banho maria à 70 °C, por duas horas. Esse foi denominado de A.

Paralelamente, 14 g de NCB, ou o equivalente ao dobro da massa de PEG, sofreram inchamento em solução aquosa de hidróxido de sódio (30% m/v). Este foi denominado de B.

Os sistemas A e B foram misturados, em proporções devidas, 1:1 ou 1:2, estequiometricamente, com auxílio de um agitador magnético equipado com aquecimento a 70 °C, por 10 horas. Ao produto final dessa última etapa, foram adicionados 100 mL de água quente (70 °C). Posteriormente, a suspensão foi neutralizada com ácido acético 0,1 mol/L até atingir pH 7. Após, realizou-se diálise contra água purificada (Sistema MilliQ-Millipore) para remover qualquer excesso de ácido e PEG livre, por 48 horas, e em seguida, o produto retido foi liofilizado.

O mesmo procedimento foi realizado com os PEGs de massa molar 200 g.mol<sup>-1</sup>, 300 g.mol<sup>-1</sup> e 400 g.mol<sup>-1</sup>, e em teóricas proporções estequiométricas de 1:1, supondo um DS (grau de substituição) igual a 1, e 1:2 supondo um DS igual a 2. As amostras geradas foram assim denominadas: NCBm-PEG 200 1:1, NCBm-PEG 200 1:2, NCBm-PEG 300 1:1, NCBm-PEG 300 1:2, NCBm-PEG 400 1:1 E NCBm-PEG 400 1:2.

# 3.2.4 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE PEGUILAÇÃO

As análises de ressonância magnética nuclear de estado sólido foram realizadas com a colaboração do Professor Doutor Edvani Curti Muniz da Universidade Estadual de Maringá, em espectrômetro RMN (Varian, modelo Mercury Plus 300 MHz). As amostras foram analisadas com tempo de relaxamento de 5,0 segundos, pulso de 90°, tempo de aquisição 0,050 s, 560 repetições. Para a análise

de ressonância magnética nuclear em solução, foi utilizado Espectrometro Bruker operando a 400 mHz, temperatura de 70 °C, para isto a amostra foi solubilizada na concentração de 24 mg/mL em uma solução de DMSO (deuterado)/ LiCl (12%).

# 3.2.5 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

Os difratogramas foram obtidos equipamento Shimadzu XRD 6000 em difratômetro com radiação de CuK $\alpha$  ( $\lambda$  = 0,15418 nm), 40 kV e 30 mA, velocidade de varredura 0,5°.min<sup>-1</sup>). O índice de cristalinidade (ICr) das amostras de celulose foi obtida a partir do método proposto por Chen *et al.* (2007), conforme equação 2.

$$IC_{r}=1-\frac{\Sigma I_{am}}{\Sigma I_{tot}}$$
(2)

em que  $\Sigma I_{am}$  representa a área abaixo da região amorfa e  $\Sigma I_{tot}$  representa a área abaixo da intensidade total medida em 2 $\Theta$  no intervalo de 11° a 30°.

Os índices de cristalinidade das amostras também foram calculados através da deconvolução das áreas do espectro de RMN, através da equação 3, onde A representa a área 4b, que corresponde ao deslocamento referente à região cristalina e 4a ao deslocamento referente à região amorfa.

$$IC_{r} = \frac{A4b}{A(4a+4b)}$$
(3)

# 3.2.6 TERMOGRAVIMETRIA (TG) E CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As análises foram realizadas utilizando TG/DSC Netzsch modelo STA449F3 Jupiter, disponibilizado pela Universidade do Vale do Itajaí em colaboração com a Professora Dra Tânia Mari Bellé Bresolin. A análise foi realizada sob atmosfera de N<sub>2</sub>, com um fluxo de gás de 20 mL.min<sup>-1</sup> e uma taxa de aquecimento de 20 °C.min<sup>-1</sup>, no intervalo de temperatura de 25 °C a 400 °C.

## 3.2.7 QUANTIFICAÇÃO DO RENDIMENTO DA PEGUILAÇÃO

Uma vez modificada, as amostras de celulose foram dissolvidas a concentração de 0,33 mg.mL<sup>-1</sup> em solução aquosa de ZnCl<sub>2</sub> 70% (m/v em água purificada) e analisadas através do método colorimétrico proposto por Sims e Snape, (1980), utilizando, como reagentes uma solução contendo BaCl<sub>2</sub> (5% m / v) em HCl (1 mol.L<sup>-1</sup>) e outra solução contendo KI (2% m / v) e l<sub>2</sub> (1,27% m / v). Misturou-se 1 mL de cada reagente mais 2 mL de celulose dissolvida na solução aquosa de ZnCl<sub>2</sub>. Após 15 minutos da adição dos reagentes, as misturas obtidas foram lidas em 535 nm, em espectrofotômetro Biospectro, modelo SSP-200, utilizando uma cubeta de quartzo, e como branco uma amostra contendo celulose não modificada dissolvida em ZnCl<sub>2</sub> 70% (m/v em H<sub>2</sub>O). Para isto, foram realizadas três curvas de calibração para cada PEG de diferentes massas molares (200 g.mol<sup>-1</sup>, 300 g.mol<sup>-1</sup> e 400 g.mol<sup>-1</sup>), com os pontos variando de 5 a 100 µg.mL<sup>-1</sup>, com r<sup>2</sup> de 0,990, as curvas foram utilizadas para determinar a quantidade de PEG foi enxertado na nanocelulose.

# 3.3 FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA E DOS FILMES ANTES E APÓS PEGUILAÇÃO

#### 3.3.1 FORMAÇÃO DO FILME

Para a produção dos filmes foi adaptada a metodologia proposta por Falt *et al.*(2003). Os produtos da peguilação foram solubilizados em uma solução de *N*óxido de *N*-metil-morfolina 50 % (m/m) a 70 °C por 2,5 horas. Na sequencia, foi adicionado DMSO para gerar uma solução com concentração final de 1mg.mL<sup>-1</sup>, diminuindo assim a viscosidade da solução e esse sistema ficou em agitação por 48 horas a temperatura ambiente. Os filmes foram depositados pela técnica de "spincoating" em uma rotação de 3500 rpm, por um minuto, em um substrato de mica, com uma camada prévia de polietilenoimina (PEI). Na sequência, os filmes obtidos foram lavados com água a fim de eliminar o solvente e armazenados em dessecador contendo sílica.

#### 3.3.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

Para as análises por AFM, foi utilizado o equipamento 5500 Agilent PicoPlus Molecular Imaging, em modo contato, com cantilever de silício oscilando de 50-100 nm de amplitude e frequência de ressonância próxima a 300 kHz. As imagens foram escaneadas em 4 regiões diferentes de 8x8µm a 1,4x1,4 µm e o processamento de imagens foi realizado utilizando-se software Pico View.

A fim de realizar testes qualitativos de adsorção da proteína fibronectina sobre as NCBm e NCBm-PEGs, foram realizadas imagens dos filmes puros e com deposição de proteína. Foi depositada a fibronectina de plasma bovino, em uma concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão (pH 7,4; NaCl 0,05 mol.L<sup>-1</sup> e Tris 0,05 mol.L<sup>-1</sup>), pela técnica de "spin-coating". Posteriormente, as amostras foram armazenadas em dessecador com sílica até a secagem, por aproximadamente 5 horas. Na sequência foi lavada com o tampão de preparo da amostra.

#### 3.3.3 TENSIOMETRIA

O efeito da modificação química da NCBm sobre a molhabilidade do filme formado foi realizado pelo método da gota séssil, a 25°C, utilizando- água purificada e diiodometano, em tensiômetro DataPhysics OCA15. Para isso foram depositadas gotas com um volume de 3 µL dos solventes, e seus ângulos de contato com a superfícies foram medidos no intervalo de 120 segundos.

Para calcular a energia livre de superfície, foi aplicado o método de Wu, o qual utiliza um solvente polar e outro apolar, na determinação das medidas de ângulo de contato ( $\theta$ ). A equação 3 (WU,1971) permitiu obter as medidas de tensão superficial da componente dispersiva em relação ao líquido ( $\gamma^{D}_{L}$ ), e em relação ao sólido ( $\gamma^{D}_{S}$ ), e ainda as medidas de tensão superficial da componente polar em relação ao líquido ( $\gamma^{P}_{L}$ ), e em relação ao sólido ( $\gamma^{P}_{S}$ ). Onde  $\gamma_{s}$  é a tensão superficial do sólido,  $\gamma_{L}$  é a tensão superficial do líquido e  $\theta$  é o ângulo de contato do líquido com a superfície (filme).

$$\gamma_L \cdot (1 + \cos\theta) = \gamma_s + \gamma_L - 4 \frac{\gamma_L^D \gamma_s^D}{\gamma_L^D + \gamma_s^D} - 4 \frac{\gamma_L^P \gamma_s^P}{\gamma_L^P + \gamma_s^P}$$
(3)

## 3.3.4 ESPECTROSCOPIA FOTOELETRÔNICA DE RAIOS –X

As análises de XPS foram efetuadas em espectrofotômetro de fotoelétrons ESCA 3000 V.G. Microtech equipado com fonte de radiação Al kα, no Departamento de Física da UFPR, com a colaboração e orientação do Prof. Dr. WidoSchreiner. Os espectros foram obtidos com ângulo de 45°, através de analisador de energia hemisférico com resolução de 0,8 eV. O tratamento de dados foi efetuado utilizando22 se o software XI SDP32 do equipamento. O processo de deconvolução usado para oC1s foi feito usando os elementos fornecidos pelo software.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1 PROCESSAMENTO MECÂNICO DA CELULOSE BACTERIANA

Inicialmente, a CB, após processamento mecânico em moinho Supermasscolloider gerou uma celulose bacteriana mecanicamente processada, que foi denominada de NCB, cuja distribuição de tamanho e topografia são apresentados na FIGURA 7.



FIGURA 7 - ANÁLISE GRANULOMÉTRICA E TOPOGRAFICA DE NCB DIÂMETRO APARENTE CUMULATIVO DAS PARTÍCULAS DE A) NANOCELULOSE (NCB) E B) MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DAS NCB, EM UM SUBSTRATO DE MICA, ÁREA DE 8 X 8 µm. APÓS O PROCESSAMENTO MECÂNICO DA CELULOSE BACTERIANA (CB) ΕM MOINHO SUPERMASSCOLLOIDER

Conforme observado, o  $d_{50\%}$  da NCB é de 30 µm, com um diâmetro aparente máximo de 100 µm. O IP determinado foi de 2,5, indicando uma amostra altamente polidispersa. Adicionalmente, a denominação de nanocelulose da CB foi utilizada, visto que a largura (133-139 nm) e altura (14 a 20 nm), conforme apresentado na FIGURA 7B, apresentam-se em escala nanométrica.

Zhao et al. (2005) avaliaram o efeito do processamento mecânico da celulose comercial vegetal. Os autores observaram que o processamento reduziu o tamanho das fibras a uma escala nanométrica, diminuindo a cristalidade e facilitando, assim, reações químicas posteriores (ZHAO *et al.*, 2005).

# 4.2 SINTESE E CARACTERIZAÇÃO DA ENXERTIA DO POLIETILENOGLICOL EM CELULOSE

Para gerar a reação de enxerto do PEG nas cadeias da NCBm, foi inicialmente necessário realizar a derivatização do PEG por halogenação. Álcoois primários, quando tratados com halohidrácidos, reagem lentamente através de uma reação de substituição nucleofílica, para gerar um haleto de alquila e água. A ordem de reatividade dos haletos de hidrogênio equiparam-se à sua acidez: HI > HBr > HCl>>HF. Com relação ao substrato, a reatividade dos álcoois, perante os haletos de hidrogênio é: álcoois primários < álcoois secundários < álcoois terciários. Para catalizar a reação de halogenação, foi adicionado cloreto de zinco ao meio reacional. Esse forma um complexo com o álcool pela associação de um par de elétrons não compartilhados do átomo de oxigênio, comportando-se portanto, como ácido de Lewis, uma vez que recebe o par de elétrons do oxigênio do PEG, promovendo a substituição nucleofílica. Este reagente HCI/ZnCl<sub>2</sub> é conhecido como reagente de Lucas (SOLOMONS, 1996).

Em reações com álcool primário, a função do ácido é produzir um substrato no qual o grupo retirante seja a molécula de água, fracamente básica, em lugar do íon hidróxido, fortemente básico. Na primeira etapa do mecanismo, o cloreto de zinco prepara o grupo retirante, na segunda etapa, ocorre o ataque do nucleófilo pela retaguarda do substrato, e por fim na terceira etapa, tem-se a recuperação do catalisador (FIGURA 8) (SOLOMONS, 1996).



FIGURA 8 - ESQUEMA REACIONAL DA HALOGENAÇÃO DO PEG, UTILIZANDO O REAGENTE DE LUCAS (HCI/ZNCl<sub>2</sub>)

Os alcóxidos da celulose sódica formados em meio alcalino, podem promover um ataque nucleofílico ao carbono halogenado do PEG-CI, realizando assim uma reação de enxertia com PEG ou reação de peguilação, com a eliminação de cloreto, que se comporta como um bom grupo abandonador. Segundo Bhalekar *et al.* (2010) a reatividade da celulose com o PEG é favorecida pelas hidroxilas ligadas ao C-6. Entretanto, Hon (1996 a,b) observou que nas reações de eterificação, realizadas em meio alcalino, as hidroxílas nos C-2 são mais reativas que as presentes no C-6 e estas que as presentes no C-3.

Apesar da celulose conter aproximadamente 31,48% de grupos hidroxíla por massa (um álcool primário e dois secundários por glucose), demonstrando uma elevada quantidade de grupos disponíveis para modificação química, nem todas as hidroxilas são igualmente reativas. A FIGURA 9 ilustra as possiblidades de enxertia de PEG nas diferentes posições em que se encontram as hidroxilas disponíveis.



FIGURA 9 - ILUSTRAÇÃO DA REAÇÃO DE SÍNTESE DO PEG COM CELULOSE

Para identificar o enxerto de PEG na estrutura da NCB, para a amostra NCBm-PEG 200, foi realizada análise de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio, conforme apresentado na FIGURA 10.

A análise de RMN de hidrogênio evidenciou a presença de PEG identificado no deslocamento químico de 3,8 ppm, também caracterizado pelo seu caráter alargado (GREENWALD *et al.*, 1996; HEALD *et al.*, 2002; LIN-GIBSON *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2005). O enxerto do PEG na estrutura da NCBm pode ser identificado através do aparecimento de diferentes sinais para hidrogênios anoméricos, influenciados pelo enxerto de PEG em C-2, C-3 e C-6, os deslocamentos de 4,4 e 5,2 ppm podem indicar as ligações covalentes entre o carbono e o PEG em diferentes posições.. Uma possível explicação, é que o deslocamento em 4,4 ppm seja referente ao hidrogênio ligado a carbono não modificado. É possível supor que os dois primeiros deslocamentos após o hidrogênio anomérico ( $\delta$  4,8 e 4,9 ppm) seja inidicativo de H-1 anomérico com modificação em C-2 e C-3, respectivamente, e o sinal em  $\delta$  5,2 ppm pode ser referente ao enxerto de PEG no C-6.



FIGURA 10 - ESPECTRO DE 1H-RMN PARA AMOSTRA DE CELULOSE BACTERIANA PEGUILADA NCBm-PEG 200 1:1. SOLVENTE DMSO/LICI À 70 °C. REALIZADA EM ESPECTROMETRO BRUKER 400 mHz

Os resultados demonstraram que o enxerto de PEG ocorre em outros carbonos que não somente o C6, como previamente referido por Bhalekar (2010). Entretanto, Hon (1996 a,b) sugere que as hidroxilas do C-2 são mais reativas nas reações de eterificação em meio alcalino.

Devido às limitações de solubilidade das amostras de NCBm e NCBm-PEG, foram realizadas adicionalmente, análises de Ressonância Magnética de Estado Sólido de Carbono, confome apresentado na TABELA 1 e na FIGURA 11 e12.

Na TABELA 1 pode-se observar  $\delta$  104 e 102 ppm, referentes ao C-1 da celulose. O deslocamento referente ao C-1 em 104 ppm, também foi observado por Porro, *et. al,* (2007), após tratarem a celulose na mesma concentração de NaOH. As amostras de NCBm-PEG apresentaram um deslocamento próximo de 96,5 ppm, o qual pode sugerir um terceiro deslocamento químico para o C-1, denominado de C-1'. Este pode estar associado ao enxerto de PEG em C-2 de unidades de glucose, causando um deslocamento para campo alto.

As reações na celulose ocorrem nos grupos hidroxilas. Assim, se fosse possível substituir todas as hidroxilas da unidade de glucopiranose disponíveis, seria obtido um grau de substituição (DS) de 3,0 por unidade de mero. Entretanto não é o que ocorre na prática. As reações com celulose não devem, simplesmente, ser

consideradas como sendo a de um álcool tri-hídrico que é semelhante em sua composição química a um açúcar possuindo três grupos hidroxilas. Além disso, as reações de celulose quase sempre ocorrem em condições heterogêneas. A heterogeneidade surge a partir do fato de que a celulose é normalmente um sólido em suspensão num meio de reação líquido. Devido à sua constituição fibrilar, a celulose possui diferentes acessibilidades ao mesmo reagente. Portanto, na formação de derivados celulósicos, o valor de DS usualmente não é zero, mas também não é três.

Observa-se, na FIGURA 12, o deslocamento químico do C-4 da NCBm, entre  $\delta$  81 e 84 ppm. De acordo com Zhao *et al.*, (2005) e Newman (1999) o primeiro deslocamento refere-se ao C-4, em campo alto, e está associado a regiões amorfas da celulose, identificado como 4a. Pode-se observar em campo mais baixo, um deslocamento para C-4 referente à regiões cristalinas da celulose, identificado na FIGURA 12, como 4b. Assim, é possível extrair informações sobre a cristalinidade da celulose, através da deconvolução da região do C-4, conforme apresentado na TABELA 1.

A degradação parcial da região amorfa da NCBm durante o enxerto com PEG foi observado, devido a uma diminuição da região do C-4a em relação ao C-4b, razão amorfo/cristalino. É possível verificar uma queda na intensidade deste deslocamento para os derivados NCBm-PEG em relação à amostra de NCBm . Outra possibilidade é que estes novos deslocamentos sejam referentes ao enxerto de PEG, que possuí cadeia hidrofilica, deslocando o sinal para campo mais alto, não alterando significativamente a cristalinidade, já que a peguilação ocorre em regiões amorfas, e o exerto também é caracterizado como um polímero amorfo.

Os deslocamentos para o C-2, C-3, e C-5, possuem ambientes químicos equivalentes, foram identificados entre  $\delta$  71,6 ppm para a NCBm e entre  $\delta$  74 e 77 ppm para as amostras de NCBm-PEG. Entretanto, o deslocamento referente ao PEG também está sobreposto nestes mesmo valores, próximos a  $\delta$  74 ppm e 63 ppm, confirmados pelo aumento na intensidade destes mesmos picos nos derivados de NCBm-PEG, o que também sugere a enxertia com PEG (BARDET *et al.*, 2007).

A presença de deslocamentos químicos próximos a  $\delta$  165 ppm são referentes a carbono de PEG que podem ter sofrido oxidação durante a reação de halogenação, deslocando-se assim para campo mais baixo (VOORHEES *et al.*, 1997; HARRIS; ROBERT, 2003)

Estes deslocamentos apresentados indicam que o exerto de PEG na NCBm foi realizado. Como já mencionada a estrutura da celulose é bastante complexa, desta forma não se tem um controle da substítuição homogênea das hidroxilas.Esta observação já foi relatada por outros autores, confere também com os resultados dos deslocamentos obtidos, os quais sugerem modificações não somente no C-6, como também no o C-2.



FIGURA 11 - ESPECTROS DE <sup>13</sup>C-RMN EM ESTADO SÓLIDO DAS AMOSTRAS DE NCBm, NCBm-PEGs

TABELA 1 - ATRIBUIÇÃO DOS DESLOCAMENTOS DE <sup>13</sup>C-RMN EM ESTADO SÓLIDO PARA AS AMOSTRAS DE NCBm E NCBm-PEGs

AMOSTRAS	C-1	C-1'	C-4	C-2,C-3,C-5	C-6
	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
Mercerizada	104 e 102		84 e 81	71,6	59,33
NCBm-PEG 200 1:1	107 e 105	96,6	89 e 88	77, 75 e 74	63,2
NCBm-PEG 200 1:2	107 e 105	97	88, 86 e 84	75	63
NCBm-PEG 300 1:1	107 e 105	96,6	89 e 88	77, 75 e 74	63
NCBm-PEG 300 1:2	107 e 105	97,7	89 e 88	75	63
NCBm-PEG 400 1:1	107 e 105	96,7	88 e 85	75	63
NCBm-PEG 400 1:2	107 e 105	97	89 e 88	77 e 75	63



FIGURA 12 – ESPECTROS DE <sup>13</sup>C -RMN EM ESTADO SÓLIDO DAS AMOSTRAS DE NCB MERCERIZADA E NCBm-PEG 200 1:1.REALIZADAS EM ESPECTRÔMETRO VARIAN, MODELO MERCURY PLUS 300 mHZ

# 4.3 ANÁLISE DA CRISTALINIDADE DAS AMOSTRAS DE NCB

As análises de difratometria de raios X (DRX) demonstraram que, em relação a NCB, houve uma queda no índice de cristalinidade após o processo de mercerização, e que pode ser explicada devido ao intumescimento da cadeia e o rompimento das ligações de hidrogênio, promovidas pela modificação da celulose do tipo I para o do tipo II. A conversão de celulose tipo I para celulose tipo II foi confirmada pelo planos 101, 102 e 200 referentes a celulose organizada antiparalelamente (ZUGENMAIER, 2001; KONO; NUMATA, 2006).

O índice de cristalinidade (IC) demonstra uma razão entre a celulose amorfa e a celulose cristalina, que depende da espécie ou do pré-tratamento da amostra. Desta forma, o grau de cristalinidade é um importante parâmetro para a acessibilidade das hidroxilas durante os processos reacionais.

Apesar da sua estrutura química única e simples, a celulose é uma molécula rígida e altamente cristalina, insolúvel em vários solventes orgânicos comuns, e pode ser considerada com um material ideal na engenharia de materiais (VARSHNEY; NAITHANI, 2011). Entretanto, a abundância de grupos hidroxila e a concomitante tendência em formar ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, resultam na formação de agregados lineares. Em estado sólido, áreas ordenadas altamente cristalinas são interespaçadas com zonas menos ordenadas, as amorfas. Estas zonas , ricas em grupos hidroxila, são prontamente mais disponíveis para as reações químicas que as áreas cristalinas, menos reativas (COFFEY *et al.*, 1995).

Os peguilados mantiveram o IC da celulose mercerizada, próximos a 40 %. Tal informação é diferente da obtida por RMN <sup>13</sup>C de sólidos, uma vez que demonstraram a diminuição da área de C-4 referentes às regiões amorfas (deslocamento em 4a), sendo assim espera-se um aumento na cristalinidade do material. Há possibilidade de que, durante o enxerto de PEG em celulose, o C-4 amorfo tenha sido deslocado para campo mais alto, o que também pode contribuir para uma redução de C-4a. Uma explicação plausível, é a de que as regiões amorfas de celulose, degradadas durante o enxerto, também tenham sido substituídas por um polímero amorfo, o PEG, mantendo a cristalinidade do material enxertado quase que inalterada. Verifica-se ainda, que as regiões cristalinas da celulose não foram afetadas de forma significativa. Assim, novamente é provável que a degradação, bem como o enxerto de PEG, tenham ocorrido nas regiões amorfas da cadeia da NCB.

Os dados de cristalinidade estão dispostos na TABELA 2, e foram calculados a partir das deconvoluções dos difratogramas e suas área calculadas. Foi realizada a deconvolução também dos espectros de <sup>13</sup>C-RMN de sólidos para as áreas referente ao halo amorfo da celulose e área cristalina.



FIGURA 13 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X PARA AS AMOSTRAS DE NCBm E NCBm-PEG.REALIZADAS EM EQUIPAMENTO SHIMADZU XRD 6000 COM RADIAÇÃO DE CUK  $\alpha$  ( $\lambda$  = 0,15418 nm), 40 kV E 30 mA, VELOCIDADE DE VARREDURA 0,5°.min<sup>-1</sup> Os cálculos de IC por RMN foram realizados através da deconvolução das

áreas cristalinas (4b) e amorfas (4a) conforme a FIGURA 14, e inseridas na equação





AMOSTRAS	IC (%) POR DRX	IC (%) POR RMN
NCB	73	
NCBm	39	38
NCBm-PEG 200 1:1	43	47
NCBm-PEG 300 1:1	41	45
NCBm-PEG 400 1:1	43	43

TABELA 2 - INDICE DE CRISTALINIDADE (IC) DA NCBm-PEG 200, NCBm-PEG 300 e NCBm-PEG 400 UTILIZANDO RESULTADOS OBTIDOS POR DRX E <sup>13</sup>C-RMN

#### 4.4 ANÁLISES TERMOGRAVIMETRICAS

As análises termogravimétricas demostraram uma similaridade na decomposição térmica entre todos os derivados NCBm-PEG, diferenciando-os na perda de massa da NCBm. A FIGURA 15, mostra o gráfico da variação da perda de massa do material pelo tempo, descontando a perda de umidade.. Os com valores de degradação térmica maiores são compatíveis com a inserção de PEG na estrutura da NCBm. A FIGURA 15, demonstra a perda de massa entre os NCBm e NCBm-PEGs. Entretanto, não é possível associar a perda de massa com o tamanho dos PEGs enxertados, uma vez que a concentração de PEG enxertado não é uniforme para todos os derivados NCB. Isto é devido a dificuldade de halogenção de PEGs maiores, bem como as variáveis da própria reação: pH, temperatura, agitação, além das limitações de acessibilidade de reagentes que são próprias da celulose.

Na celulose, devido à forte intensidade das ligações de hidrogênio intermoleculares, a decomposição da amostra ocorre antes do seu ponto de fusão. Desta forma, o evento encontrado com T<sub>P</sub> em 345°C está associado a decomposição térmica do polímero.

Foi possível observar dois eventos, o primeiro entre 80 °C a 100 °C referente a perda de água na amostra e o segundo evento, entre 314-357 °C (TABELA 3), associado a decomposição da NCBm-PEG, a qual difere da NCBm que inicia a decomposição em 318 °C. Adicionalmente, a ausência de um terceiro evento de perda de massa, pode sugerir que não há presença de PEG livre na amostra, com decomposição entre 200 e 300 °C.

AMOSTRA	PERDA DE	TP	Tı	TF
	MASSA TOTAL	(°C)	(°C)	(°C)
	%			
NCBm	76	345	318	357
NCBm-PEG 200 1:1	79	342	323	352
NCBm-PEG 200 1:2	79,1	339	323	350
NCBm-PEG 300 1:1	74,1	335	314	349
NCBm-PEG 300 1:2	80	339	324	349
NCBm-PEG 400 1:1	80,4	342	324	353
NCBm-PEG 400 1:2	77,5	342	321	353

TABELA 3 - DADOS DE ANALISE TERMOGRAVIMETRICA PARA AS AMOSTRAS DE NCBm E NCBm-PEG 200, NCBm-PEG 300 e NCBm-PEG 400

T<sub>P</sub>: indica a temperatura do pico de decomposição térmica, T<sub>I</sub> e T<sub>F</sub> indicam temperatura inicial e final de decomposição.



FIGURA 15 - A) ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DE PERDA DE MASSA, EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, PARA AS AMOSTRAS DE CELULOSE MERCERIZADA E NCBm-PEGS. B) 1a DERIVADA (d%massa/dT) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA. REALIZADAS EM EQUIPAMENTO TG/DSC NETZSCH MODELO STA449F3 JUPITER 30 °C A 400 °C, ATMOSFERA DE N<sub>2</sub> 20mL.min<sup>-1</sup> E UMA TAXA DE AQUECIMENTO DE 20 °C.min<sup>-1</sup>

A degradação da celulose acontece acima de 300°C, pelo rompimento das ligações C-H, C-O e C-C. Ocorre uma despolimerização e resulta como produto principal a formação do intermediário levoglucosana, envolvendo a formação de um éter entre o C-6 e o C-1 da glucose. Entretanto, outros derivados furânicos são também produzidos (SCHEIRS *et al.*, 2001; RAMOS *et al.*, 2005).

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DO RENDIMENTO DAS PEGUILAÇÕES

A quantificação de PEG, de acordo com a metodologia descrita por Sims e Snape (1980), a coloração é obtida através da interação do PEG com os íons triiodeto, conforme indicado (FIGURA 16) o qual absorve em comprimentos de onda próximos a 535 nm. No entanto, não foi possível a utilização desta técnica para NCBm-PEG 400 e NCBm-PEG 300, devido à precipitação dos derivados NCBm-PEG com maior massa molar, gerando uma elevada turbidez do meio (SIMS; SNAPE, 1980).

Também foram realizados cálculos do teor de enxertia com PEG em NCBm, utilizando as informações provenientes dos espêctros de RMN das áreas relativas aos diferentes deslocamentos de C-1' e C-1, referentes às modificações e para deslocamentos que não apresentam modificações. Os dados estão dispostos na TABELA 4.



Como observado na TABELA 4, os rendimentos de enxerto de PEG para os derivados NCBm-PEG 200 foram muito próximos aos determinados por RMN, através da integração dos deslocamentos de C-1 e C-1'. Assim, assume-se que para os demais derivados, é possível que os rendimentos calculados de enxerto com PEG em NCBm estejam próximos aos obtidos.

TABELA 4-DADOS DA QUANTIFICAÇÃO COLORIMÉTRIA DE POLIETILENOGLICOL NAS AMOSTRAS

NCBm-PEG 200 1:1	4,6 %	0,01	
NCBm-PEG 200 1:2	6,5 %	0,01	
NCBm-PEG 300 1:1	-	-	
NCBm-PEG 300 1:2	-	-	
NCBm-PEG 400 1:1	-	-	
NCBm-PEG 400 1:2	-	-	

\*Rendimento aproximado determinado utilizado os deslocamentos em  $\delta$  98 ppm e  $\delta$  101 a 107 ppm

# 4.6 TENSIOMETRIA

Após a solubilização dos derivados NCBm e NCBm-PEGs em uma solução de *N*-óxido de *N*-metilmorfolina e DMSO, foi realizada a deposição dos polímeros, sobre mica, com uma camada prévia de PEI. Sobre os filmes de NCBm e NCBm-PEGs foram determinados os ângulos de contato para a água (FIGURA 17) e para diiodometano (FIGURA 18) nas superfícies dos filmes.





FIGURA 17 - IMAGENS DOS PERFIS DE GOTAS, SOBRE OS FILMES DE NCBM E NCBM-PEG DEPOSITADOS EM MICA, USANDO COMO SOLVENTE ÁGUA PURIFICADA. DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO EM EQUIPAMENTO TENSIÔMETRO DATAPHYSICS OCA15, VOLUME DE 3 µL DE ÁGUA.





FIGURA 18 - IMAGENS DOS PERFIS DE GOTAS, SOBRE OS FILMES DE NCBm E NCBm-PEG DEPOSITADOS EM MICA, USANDO COMO SOLVENTE DIIODOMETANO. DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO EM EQUIPAMENTO TENSIÔMETRO DATAPHYSICS OCA15, VOLUME DE 3 µL DE DIIODOMETANO

Pode-se observar que os filmes formados com NCBm-PEG, com aumento na cadeia do PEG enxertado, apresentaram uma redução do ângulo de contado com a água, mostrando-se assim mais hidrofílicos. Para o diiodometano, ocorreu um processo inverso, os menores ângulos de contato ( $\theta$ ) foram observados para NCBm, e houve um aumento de  $\theta$ , para os derivados de NCBm enxertados com PEG. Os filmes de NCBm e NCBm-PEG foram adicionalmente avaliados quanto à cinética da gota de água depositada, conforme a FIGURA 19 e FIGURA 20.



FIGURA 19 - CINÉTICA DE MOLHABILIDADE DOS FILMES DE NCBm E NCBm-PEG UTILIZANDO COMO SOLVENTE ÁGUA. EQUIPAMENTO TENSIÔMETRO DATAPHYSICS OCA15, VOLUME DE 3 μL DE ÁGUA



FIGURA 20 - CINÉTICA DE MOLHABILIDADE DOS FILMES DE NCBM E NCBM-PEG UTILIZANDO COMO SOLVENTE DIIODOMETANO. EQUIPAMENTO TENSIÔMETRO DATAPHYSICS OCA15, VOLUME DE 3 µL DE DIIODOMETANO

Na FIGURA 19, a cinética das gotas depositadas em até 120 s demonstra claramente que, para a água, os ângulos de contato permaneceram praticamente constantes, em todo o tempo de avaliação, tanto para NCBm ou para os derivados NCBm-PEGs. Adicionalmente, a enxertia de PEG aumentou a molhabilidade dos filmes (FIGURA 17 e 18) observados através de uma redução no ângulo de contato da água com a superfície do filme. Utilizando como solvente diiodometano (FIGURA 20), observa-se claramente um aumento do ângulo de contato para a NCBm enxertada com PEG, e ângulos constantes durante os 120 s de análise.

Utilizando os ângulos de contato para a água e para o diiodometano, foi possível determinar os componentes polares e dispersivos da interface. Para superfícies com baixa energia, como os filmes, a tensão interfacial sólido-vapor pode ser equivalente e a energia superficial do sólido vácuo. Para calcular a energia livre de superfície, foi utilizado o método de Wu, o qual utiliza um solvente polar e outro apolar, na determinação das medidas de ângulo de contato ( $\theta$ ).

As medidas de tensão superficial da componente dispersiva em relação ao líquido ( $\gamma^{D}$  L), e em relação ao sólido ( $\gamma^{D}$  s), e polar em relação ao líquido ( $\gamma^{P}$  L) e em relação ao sólido ( $\gamma^{P}$  s) foram obtidas utilizando-se a equação 3. Os dados de energia livre de superfície estão sumarizados na TABELA 5, onde se pode confirmar o caráter mais hidrofóbico da NCBm, quando comparado aos derivados NCBm-PEG, visto que a medida da componente polar é inferior ao da componente dispersivo. Assim, a avaliação dos dois componentes, polar e dispersivo, permitiu qualificar os filmes obtidos com produtos de enxerto da NCBm com PEG como mais hidrofílicos em relação à NCBm. Entretanto, para as amostras modificadas ainda prevalece o caráter hidrofóbico, exceto para a amostra PEG 200 g.mol<sup>-1</sup> 1:1, que apresenta um valor maior para componente polar em relação a apolar.

TABELA	5 -	DADOS	DE	ENERGIA	LIVRE	DE	SUPERFÍCIE	DETERMINADOS	PELO
MÉTODO	DE V	NU PARA	AS	AMOSTRAS	S DE NC	Bm E	E NCBm-PEGs		

AMOSTRAS	ENERGIA	COMP.	COMP. POLAR	ÂNGL	JLO DE
	LIVRE DE	DISPERSIVA	(mN/m)	CONT	ΑΤΟ Θ
	SUPERFÍCIE	(mN/m)		$H_2O$	$CH_2I_2$
	(mN/m)				
NCBm	49,83 ± 0,36	41,7 ± 0,26	8,12 ± 0,24	79	27
NCBm-PEG 200 1:1	67,19 ± 0,42	$30,14 \pm 0,34$	$37,05 \pm 0,25$	28	52
NCBm-PEG 200 1:2	58,69 ± 1,28	32,31 ± 0,10	26,4 ± 1,28	47	48
NCBm-PEG 300 1:1	63,34 ± 0,27	37,35 ± 0,21	$26,0 \pm 0,17$	44	37
NCBm-PEG 300 1:2	61,57 ± 0,97	34,56 ± 0,12	27,01 ± 0,97	44	43
NCBm-PEG 400 1:1	58,18 ± 0,19	36,08 ± 0,11	22,1 ± 0,15	52	40
NCBm-PEG 400 1:2	64,61 ± 1,43	$35,18 \pm 0,73$	29,43 ± 1,24	40	42

Oh e Luner (1999) avaliaram a energia livre de superfície da etilcelulose, e observaram um decréscimo em relação a celulose, ou seja a etilcelulose tem um caráter mais hidrofóbico que a celulose. Isso ocorre porque as hidroxilas que foram substituídas pelo grupo etil, reduzindo assim a polaridade da celulose. Este estudo pode ser associado aos resultados encontrados, visto que aqui objetivou o inverso, uma vez que adicionamos grupos mais hidrofílicos, resultando em energias livres de superfície maiores (TABELA 5), promovendo maior hidrofilicidade aos filmes obtidos.

### 4.7 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

## 4.7.1 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA DOS FILMES

Os filmes depositados também foram avaliados por microscopia de força atômica (AFM). Na FIGURA 21, observa-se um filme com características amorfa para NCBm, de forma semelhante ao observado por Notley e Wagberg (2005). As imagens mostraram uma organização diferente na medida em que as cadeias de PEG enxertadas foram aumentando. Nota-se o acúmulo do material em várias regiões da mica. Há também, uma visível alteração morfológica dos filmes.

Vários campos da superfície do filme foram avaliados (ao menos 4 campos de 8x8µm), confirmando os estudos de cinética de deposição de água sobre a superfície dos filmes, realizados por tensiometria. É necessário também salientar que o processo de dissolução, é de fato problematizado na preparação de filmes celulósicos, visto que apesar do material se apresentar mais hidrofílico, conforme as analises de ângulo de contato, a solubilidade não foi alterada em relação ao material de partida.

# 4.7.2 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA DOS FILMES COM FIBRONECTINA DEPOSITADA.

Os testes de adsorção proteica foram realizados utilizando-se fibronectina, que é uma proteína que desempenha um papel bastante importante no processo de crescimento celular. Essa molécula pode interagir diretamente com uma superfície (material estranho). Após o primeiro contato, novas proteínas podem se associar com as superfícies, como colágenos e lamininas, influenciando a interação com as células. Estas reconhecem as proteínas de matriz através das integrinas - uma família de receptores de superfície celular, uma vez que a integrinas são ocupadas elas desenvolvem complexos de adesão focal proporcionando a ancoragem de células à superfície e, consequentemente, desencadeiam а resposta celular (HYNES, 2002).

Para os filmes com fibronectina depositada, é possível observar, na FIGURA 21, uma maior adsorção sobre a amostra NCBm em relação às demais amostras NCBm-PEGs. Esta adsorção é ligeiramente diminuída na medida em que as massas molares de PEG aumentam, este fato se deve ao impedimento estéreo da adsorção causado pelas cadeias de PEG.



FIGURA 21 - IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DAS AMOSTRAS DE NCBM E NCBM-PEG COM OU SEM FIBRONECTINA DEPOSITADA. UTILIZANDO MICA COMO SUBSTRATO, REALIZADAS EM MICROSCÓPIA 5500 AGILENT PICOPLUS MOLECULAR IMAGING, EM MODO CONTATO, ÁREA DE 8 µm X 8 µm

A FIGURA 22 representa uma possível explicação para o comportamento da fibronectina sobre os filmes de NCBm-PEGs, a qual representa a fibronectina adsorvida à regiões menos hidrofílicas, conforme identificada nas imagens de AFM e análise de ângulo de contato. A fibronectina tende a interagir com ela própria, sendo repelida pelo PEG para fora do plano.

Desta forma, entende-se que a influência sobre a adsorção está relacionada com o tamanho das cadeias de PEG. Entretanto, não é possível avaliar a mesma influencia sobre a concentração de PEG enxertado.



FIGURA 22 – REPRESENTAÇÃO EQUEMÁTICA DA ADSORÇÃO DA FIBRONECTINA SOBRE OS FILMES DE NCBm E NCBm-PEG.

# 4.7.3 ESPECTROSCOPIA FOTOELETRÔNICA DE RAIOS – X

Foi investigado a adsorção de fibronectina em NCBm e NCBm-PEG funcionalizado com PEG de massa molar 400g.mol<sup>-1</sup>. Além disso, considerando o espectro de XPS para carbono e nitrogênio (C1s XPS e espectros N1s) (Tabela 4). A intensidade do pico N1s foi usada para estimar a quantidade de proteína adsorvida. O pico de espectro alta resolução de N 1s pode ser decomposto em dois

picos, 399,6 e 400,5 eV, característicos de NH<sup>3+</sup> grupos e amina e grupos amida, respectivamente. O espectro de alta resolução C1s pode ser decomposto em três componentes, 285.0 (hidrocarboneto), 286,4 (C-N e C-O) e 288,3 (N-C = O e O-C = O) eV. A razão atômica N total / C total foi 0,295 e 0,185 para amostras de NCBm e NCBm-PEG- 400, respectivamente, filmes espessos de NCB m- fibronectina apresentam, 0,27 para valores teóricos e 0,29 valores práticos para NCBm. Estes resultados mostraram claramente que o revestimento com fibronectina na superfície NCBm foi completo, enquanto que em NCBm-PEG 400 ocorreu um revestimento parcial.

Energia de ligação (eV)		NE	3Cm	NBCm-PEG 400	
		Total (%)	Valor relativo	Total (%)	Valor relativo
		( )	(%)		(%)
	285,0		43,4		71,5
C1s	286,2	64,7	32,3	71,4	25,3
	287,8		24,2		3,2
N1s	399,6	10,6	-	7,3	-
01s	535.0	24 7	-	21 24	-

TABELA 6- ANÁLISE DE XPS DOS FILMES DE NCBm E NCBm-PEG 400 REVESTIDOS COM FIBRONECTINA

#### 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

As análises de RMN e DRX não demonstram a degradação da região cristalina da celulose, sugerindo a enxertia de PEG em zonas amorfas da celulose mercerizada. Em análise de DRX foi possível confirmar a mercerização da celulose, a qual se organizou de forma antiparalela, observada pelo desaparecimento do plano 110, bem como pelo o decréscimo no índice de cristalinidade, o que pode ter contribuído para a reação de enxertia de PEG na celulose. Os dados de cristalinidade obtidos por DRX e RMN, possibilitam concluir que houve degradação e ou enxertia de PEG do material em regiões amorfas.

Nas análises termogravimétricas foi possível verificar dois eventos, uma para perda de umidade e o outro para decomposição do material, ambos endotérmicos.

A partir dos filmes foi observado pelas análises de ângulo de contato, uma maior molhabilidade com água dos filmes em que a NCBm foi enxertada com PEG em relação à celulose mercerizada, atingindo-se assim, o objetivo de tornar o material mais hidrofílico. Nos filmes com fibronectina adsorvida, foi possível relacionar as cadeias de PEG com a baixa adsorção de proteína sobre o filme polimérico, verificou-se a repulsão do PEG com a proteína.

#### REFERENCIAS

AMIJI, M.; PARK, K. Prevention of protein adsorption and platelet adhesion on surfaces by PEO/PPO/PEO triblock copolymers. **Biomaterials**. v. 13, n. 10, p. 682-692, 1992.

ARAKI, J.; WADA, M.; KUGA, S. Steric Stabilization of a Cellulose Microcrystal Suspension by Poly(ethylene glycol) Grafting. **Langmuir**. v. 17, n. 1, p. 21-27, 2000.

BARDET, M.; GERBAUD, G.; TRÂN, Q.-K.; HEDIGER, S. Study of interactions between polyethylene glycol and archaeological wood components by 13C high-resolution solid-state CP-MAS NMR. **Journal of Archaeological Science**. v. 34, n. 10, p. 1670-1676, 2007.

BHALEKAR, M. R.; DESALE, S. S.; MADGULKAR, A. R. Synthesis of MCC-PEG conjugate and its evaluation as a superdisintegrant. **CORD Conference Proceedings**. v. 11, n. 3, p. 1171-1178, 2010.

BHATTARAI, N.; RAMAY, H. R.; GUNN, J.; MATSEN, F. A.; ZHANG, M. PEGgrafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. **Journal of Controlled Release**. v. 103, n. 3, p. 609-624, 2005.

CHARPENTIER, P. A.; MAGUIRE, A.; WAN, W.-K. Surface modification of polyester to produce a bacterial cellulose-based vascular prosthetic device. **Applied Surface Science**. v. 252, n. 18, p. 6360-6367, 2006.

COATES, J. Interpretation of Infrared Spectro, A practical Approach. Chichester, 2000.

COFFEY DG, BELL DA, HENDERSON A (1995) Food polysaccharides and their application. Marcel Dekker, New York

CZAJA, W.; KRYSTYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN JR, R. M. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. **Biomaterials**. v. 27, n. 2, p. 145-151, 2006.

CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN, R. M. The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. **Biomacromolecules**. v. 8, n. 1, p. 1-12, 2006.

DE SOUZA, C. F.; LUCYSZYN, N.; WOEHL, M. A.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C.; BORSALI, R.; SIERAKOWSKI, M. R. Property evaluations of dry-cast reconstituted bacterial cellulose/tamarind xyloglucan biocomposites. **Carbohydrate Polymers**. v. 93, n. 1, p. 144-153, 2013.

FÄLT, S.; WÅGBERG, L.; VESTERLIND, E.-L. Swelling of Model Films of Cellulose Having Different Charge Densities and Comparison to the Swelling Behavior of Corresponding Fibers. Langmuir. v. 19, n. 19, p. 7895-7903, 2003.

FEE, C. J.; VAN ALSTINE, J. M. PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues. **Chemical Engineering Science**. v. 61, n. 3, p. 924-939, 2006.

FINK, H.; FAXÄLV, L.; MOLNÁR, G. F.; DROTZ, K.; RISBERG, B.; LINDAHL, T. L.; SELLBORN, A. Real-time measurements of coagulation on bacterial cellulose and conventional vascular graft materials. **Acta Biomaterialia**. v. 6, n. 3, p. 1125-1130, 2010.

FONTANA, J. D.; SOUZA, A. M.; FONTANA, C. K.; TORRIANI, I. L.; MORESCHI, J. C.; GALLOTTI, B. J.; SOUZA, S. J.; NARCISCO, G. P.; BICHARA, J. A.; FARAH, L. F. X. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 24-25, n. 1, p. 253-264, 1990.

FRANZ, S.; RAMMELT, S.; SCHARNWEBER, D.; SIMON, J. C. Immune responses to implants – A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. **Biomaterials**. v. 32, n. 28, p. 6692-6709, 2011.

FREUDENBERG, U.; ZSCHOCHE, S.; SIMON, F.; JANKE, A.; SCHMIDT, K.; BEHRENS, S. H.; AUWETER, H.; WERNER, C. Covalent Immobilization of Cellulose Layers onto Maleic Anhydride Copolymer Thin Films. **Biomacromolecules**. v. 6, n. 3, p. 1628-1634, 2005.

FRUIJTIER-PÖLLOTH, C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. **Toxicology**. v. 214, n. 1–2, p. 1-38, 2005.

GEA, S.; REYNOLDS, C. T.; ROOHPOUR, N.; WIRJOSENTONO, B.; SOYKEABKAEW, N.; BILOTTI, E.; PEIJS, T. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource Technology**. v. 102, n. 19, p. 9105-9110, 2011.

GRANDE, C. J.; TORRES, F. G.; GOMEZ, C. M.; CARMEN BAÑÓ, M. Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**. v. 5, n. 5, p. 1605-1615, 2009.

GREENWALD, R. B.; PENDRI, A.; MARTINEZ, A.; GILBERT, C.; BRADLEY, P. PEG Thiazolidine-2-thione, a Novel Reagent for Facile Protein Modification: Conjugation of Bovine Hemoglobin. **Bioconjugate Chemistry**. v. 7, n. 6, p. 638-641, 1996.

HARRIS, J. M.; ROBERT, B. C. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 2, n. 3, p. 214-221, 2003.

HEALD, C. R.; STOLNIK, S.; KUJAWINSKI, K. S.; DE MATTEIS, C.; GARNETT, M. C.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S.; PURKISS, S. C.; BARLOW, R. J.; GELLERT, P. R. Poly(lactic acid)-Poly(ethylene oxide) (PLA-PEG) Nanoparticles: NMR Studies of

the Central Solidlike PLA Core and the Liquid PEG Corona. **Langmuir**. v. 18, n. 9, p. 3669-3675, 2002.

HOLMBERG, M.; BERG, J.; STEMME, S.; ÖDBERG, L.; RASMUSSON, J.; CLAESSON, P. Surface Force Studies of Langmuir–Blodgett Cellulose Films. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 186, n. 2, p. 369-381, 1997.

HON. D.N.S (1996 a). **Cellulose and its derivatives. In: Dumitriu S** (ed) Polysaccharides in medicinal applications. Marcel Dekker, New York.

HON. D.N.S (1996 b). Chemical modification of lignocellulosic material. Marcel Dekker, New York

HONG, L.; WANG, Y. L.; JIA, S. R.; HUANG, Y.; GAO, C.; WAN, Y. Z. Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route. **Materials Letters**. v. 60, n. 13–14, p. 1710-1713, 2006.

HYNES, R. O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. **Cell**. v. 110, n. 6, p. 673-687, 2002.

IBRAHIM, M. M.; EL-ZAWAWY, W. K.; NASSAR, M. A. Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol/nanospherical cellulose particle films. **Carbohydrate Polymers**. v. 79, n. 3, p. 694-699, 2010.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**. v. 35, n. 2, p. 261-270, 2000.

ISOGAI, A. NMR analysis of cellulose dissolved in aqueous NaOH solutions. **Cellulose**. v. 4, n. 2, p. 99-107, 1997

ISOGAI, A.; SAITO, T.; FUKUZUMI, H. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. **Nanoscale**. v. 3, n. 1, p. 71-85, 2011.

KIM, Y. H.; HAN, D. K.; PARK, K. D.; KIM, S. H. Enhanced blood compatibility of polymers grafted by sulfonated PEO via a negative cilia concept. **Biomaterials**. v. 24, n. 13, p. 2213-2223, 2003.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.-P.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angewandte Chemie International Edition**. v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**. v. 26, n. 9, p. 1561-1603, 2001.

KOIZUMI, S.; YUE, Z.; TOMITA, Y.; KONDO, T.; IWASE, H.; YAMAGUCHI, D.; HASHIMOTO, T. Bacterium organizes hierarchical amorphous structure in microbial cellulose. **The European Physical Journal E**. v. 26, n. 1-2, p. 137-142, 2008.

KOLPAK, F. J.; WEIH, M.; BLACKWELL, J. Mercerization of cellulose: 1. Determination of the structure of Mercerized cotton. **Polymer**. v. 19, n. 2, p. 123-131, 1978.

KONO, H.; NUMATA, Y. Structural investigation of cellulose I $\alpha$  and I $\beta$  by 2D RFDR NMR spectroscopy: determination of sequence of magnetically inequivalent d-glucose units along cellulose chain. **Cellulose**. v. 13, n. 3, p. 317-326, 2006.

KONTTURI, E.; THÜNE, P. C.; NIEMANTSVERDRIET, J. W. Novel method for preparing cellulose model surfaces by spin coating. **Polymer**. v. 44, n. 13, p. 3621-3625, 2003.

KROON-BATENBURG, L. M. J.; KROON, J. The crystal and molecular structures of cellulose I and II. **Glycoconjugate Journal**. v. 14, n. 5, p. 677-690, 1997.

LEE, J. H.; JU, Y. M.; KIM, D. M. Platelet adhesion onto segmented polyurethane film surfaces modified by addition and crosslinking of PEO-containing block copolymers. **Biomaterials**. v. 21, n. 7, p. 683-691, 2000.

LIN-GIBSON, S.; BENCHERIF, S.; COOPER, J. A.; WETZEL, S. J.; ANTONUCCI, J. M.; VOGEL, B. M.; HORKAY, F.; WASHBURN, N. R. Synthesis and Characterization of PEG Dimethacrylates and Their Hydrogels. **Biomacromolecules**. v. 5, n. 4, p. 1280-1287, 2004.

MARCOTTE, L.; TABRIZIAN, M. Sensing surfaces: Challenges in studying the cell adhesion process and the cell adhesion forces on biomaterials. **Irbm**. v. 29, n. 2–3, p. 77-88, 2008.

NEWMAN, R. H. Estimation of the lateral dimensions of cellulose crystallites using 13C NMR signal strengths. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**. v. 15, n. 1, p. 21-29, 1999.

NOTLEY, S. M.; WÅGBERG, L. Morphology of Modified Regenerated Model Cellulose II Surfaces Studied by Atomic Force Microscopy: Effect of Carboxymethylation and Heat Treatment. **Biomacromolecules**. v. 6, n. 3, p. 1586-1591, 2005.

OH, E.; LUNER, P. E. Surface free energy of ethylcellulose films and the influence of plasticizers. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 188, n. 2, p. 203-219, 1999.

PICHETH, G.; SIERAKOWSKI, M.; WOEHL, M.; PIRICH, C.; SCHREINER, W.; PONTAROLO, R.; FREITAS, R. Characterisation of ultra-thin films of oxidised bacterial cellulose for enhanced anchoring and build-up of polyelectrolyte multilayers. **Colloid and Polymer Science**. v. 292, n. 1, p. 97-105, 2014.

PIRICH C.: Síntese de nanocristais de celulose bacteriana e sua aplicação no desenvolvimento de nanopartículas revestidas com xiloglucana de *tamarindus indica* I. Curitiba, 2013, Dissertação de mestrado- Bioquímica - UFPR.

PORRO, F.; BÉDUÉ, O.; CHANZY, H.; HEUX, L. Solid-State 13C NMR Study of Na-Cellulose Complexes. **Biomacromolecules**. v. 8, n. 8, p. 2586-2593, 2007.

RAGASEEMA, V. M.; UNNIKRISHNAN, S.; KALLIYANA KRISHNAN, V.; KRISHNAN, L. K. The antithrombotic and antimicrobial properties of PEG-protected silver nanoparticle coated surfaces. **Biomaterials**. v. 33, n. 11, p. 3083-3092, 2012.

RAMOS, L. A.; FROLLINI, E.; KOSCHELLA, A.; HEINZE, T. Benzylation of cellulose in the solvent dimethylsulfoxide/tetrabutylammonium fluoride trihydrate. **Cellulose**. v. 12, n. 6, p. 607-619, 2005.

ROBERTS, M. J.; BENTLEY, M. D.; HARRIS, J. M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 64, Supplement, n. 0, p. 116-127, 2012.

ROY, D.; SEMSARILAR, M.; GUTHRIE, J. T.; PERRIER, S. Cellulose modification by polymer grafting: a review. **Chemical Society Reviews**. v. 38, n. 7, p. 2046-2064, 2009.

SAITO, T.; KIMURA, S.; NISHIYAMA, Y.; ISOGAI, A. Cellulose Nanofibers Prepared by TEMPO-Mediated Oxidation of Native Cellulose. **Biomacromolecules**. v. 8, n. 8, p. 2485-2491, 2007.

SAMSAMSHARIAT, S. A.; HASHEMZADEH, M.; SAMSAMSHARIAT, Z.; MOVAHED, M.-R. Cardiovascular and hemodynamic effect of polyethylene glycol in Rats. **Cardiovascular Revascularization Medicine**. v. 6, n. 2, p. 70-72, 2005.

STEPANOVA, G. A.; PAKSHVER, A. B.; KALLER, A. L.; PONOMAREVA, M. A.; POLYAKOVA, G. V.; GOIKHMAN, A. S. The swelling of alkali cellulose in sodium hydroxide solutions. **Fibre Chemistry**. v. 13, n. 6, p. 405-407, 1982.

SCHEIRS, J.; CAMINO, G.; TUMIATTI, W. Overview of water evolution during the thermal degradation of cellulose. **European Polymer Journal**. v. 37, n. 5, p. 933-942, 2001.

SCHUMANN, D.; WIPPERMANN, J.; KLEMM, D.; KRAMER, F.; KOTH, D.; KOSMEHL, H.; WAHLERS, T.; SALEHI-GELANI, S. Artificial vascular implants from bacterial cellulose: preliminary results of small arterial substitutes. **Cellulose**. v. 16, n. 5, p. 877-885, 2009.

SCOTT, E. A.; NICHOLS, M. D.; CORDOVA, L. H.; GEORGE, B. J.; JUN, Y.-S.; ELBERT, D. L. Protein adsorption and cell adhesion on nanoscale bioactive coatings formed from poly(ethylene glycol) and albumin microgels. **Biomaterials**. v. 29, n. 34, p. 4481-4493, 2008.

SILVERSTEIN, M. R.; WEBSTER, X. F.; KIEMLE, J. D. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. Rio de Janeiro, 2007.

SIMS, G. E. C.; SNAPE, T. J. A method for the estimation of polyethylene glycol in plasma protein fractions. **Analytical Biochemistry**. v. 107, n. 1, p. 60-63, 1980.

SLEZAK, A.; KUCHARZEWSKI, M.; FRANEK, A.; TWADORKES, W. Evaluation of the efficiency of venous leg ulcer treatment with amembrane dressing. **Medical Engineering & Physics**. v. 26, n. 1, p. 53-60, 2004

SOLOMONS, G. W. T. Química Orgânica 1. Rio de Janeiro, 1996.

SUN, X.-L.; STABLER, C. L.; CAZALIS, C. S.; CHAIKOF, E. L. Carbohydrate and Protein Immobilization onto Solid Surfaces by Sequential Diels-Alder and Azide-Alkyne Cycloadditions. **Bioconjugate Chemistry**. v. 17, n. 1, p. 52-57, 2005.

TANG, S.; BAKER, G. A.; RAVULA, S.; JONES, J. E.; ZHAO, H. PEG-functionalized ionic liquids for cellulose dissolution and saccharification. **Green Chemistry**. v. 14, n. 10, p. 2922-2932, 2012.

TORRES, F.; COMMEAUX, S.; TRONCOSO, O. Biocompatibility of Bacterial Cellulose Based Biomaterials. **Journal of Functional Biomaterials**. v. 3, n. 4, p. 864-878, 2012.

TZIAMPAZIS, E.; KOHN, J.; MOGHE, P. V. PEG-variant biomaterials as selectively adhesive protein templates: model surfaces for controlled cell adhesion and migration. **Biomaterials**. v. 21, n. 5, p. 511-520, 2000.

VARSHNEY, V. K.; NAITHANI, S. (2011). Chemical Functionalization of Cellulose Derived from Nonconventional Sources. <u>Cellulose Fibers: Bio- and Nano-Polymer</u> <u>Composites</u>. KALIA, S., KAITH, B. S. and KAUR, I., Springer Berlin Heidelberg: 43-60.

VOORHEES, K. J.; STEVENSON, D. N.; SUN, Y.; MACIEL, G. E. A solid state 13C nuclear magnetic resonance investigation of the thermal degradation of a poly(ethylene glycol) and poly(vinyl alcohol) binder in an alumina ceramic. **Journal of Materials Science**. v. 32, n. 8, p. 2115-2120, 1997.

WAN, Y. Z.; HUANG, Y.; YUAN, C. D.; RAMAN, S.; ZHU, Y.; JIANG, H. J.; HE, F.; GAO, C. Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**. v. 27, n. 4, p. 855-864, 2007.

WIELAND, J. A.; HOUCHIN-RAY, T. L.; SHEA, L. D. Non-viral vector delivery from PEG-hyaluronic acid hydrogels. **Journal of Controlled Release**. v. 120, n. 3, p. 233-241, 2007.

WU, S. Calculation of interfacial tension in polymer systems. **Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia**. v. 34, n. 1, p. 19-30, 1971.

YAN, L.; WANG, Y.; CHEN, J. Fabrication of a model cellulose surface from straw with an aqueous sodium hydroxide/thiourea solution. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 110, n. 3, p. 1330-1335, 2008.

YIN, J.; LUO, K.; CHEN, X.; KHUTORYANSKIY, V. V. Miscibility studies of the blends of chitosan with some cellulose ethers. **Carbohydrate Polymers**. v. 63, n. 2, p. 238-244, 2006.

ZHANG, M.; LI, X. H.; GONG, Y. D.; ZHAO, N. M.; ZHANG, X. F. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG. **Biomaterials**. v. 23, n. 13, p. 2641-2648, 2002.

ZHAO, H.; KWAK, J. H.; WANG, Y.; FRANZ, J. A.; WHITE, J. M.; HOLLADAY, J. E. Effects of Crystallinity on Dilute Acid Hydrolysis of Cellulose by Cellulose Ball-Milling Study. **Energy & Fuels**. v. 20, n. 2, p. 807-811, 2005.

ZIMMERMANN, K. A.; LEBLANC, J. M.; SHEETS, K. T.; FOX, R. W.; GATENHOLM, P. Biomimetic design of a bacterial cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone healing applications. **Materials Science and Engineering: C**. v. 31, n. 1, p. 43-49, 2011.

ZUGENMAIER, P. Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers. **Progress in Polymer Science**. v. 26, n. 9, p. 1341-1417, 2001.