



REDEMAT

REDE TEMÁTICA EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

UFOP – CETEC – UEMG



Tese de Doutorado

“Preparação e caracterização de géis de alginato, quitosana e nanoceluloses para aplicações biomédicas”



Autora: Priscila de Freitas Siqueira Carvalho

Orientador: Prof. Vagner Roberto Botaro



2019



REDEMAT

REDE TEMÁTICA EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

UFOP – CETEC – UEMG

Priscila de Freitas Siqueira Carvalho

“Preparação e caracterização de géis
de alginato, quitosana e nanoceluloses
para aplicações biomédicas”

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais da REDEMAT, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Processos de fabricação/ Materiais Poliméricos/ Compósitos

Orientador: Prof. Dr. Vagner Roberto Botaro

Coorientadores: Prof. Dr. Fabiano Vargas Pereira

Prof^a. Dr^a. Kátia Monteiro Novack

Ouro Preto, março de 2019

C331p

Carvalho, Priscila de Freitas Siqueira.

Preparação e caracterização de géis de alginato, quitosana e nanoceluloses para aplicações biomédicas [manuscrito] / Priscila de Freitas Siqueira Carvalho. - 2019.

186f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Vagner Roberto Botaro.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. REDEMAT. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais.

Área de Concentração: Processos de Fabricação.

1. Géis. 2. Viabilidade celular. 3. Propriedades mecânicas. 4. Biomateriais. 5. Nanotecnologia. I. Botaro, Vagner Roberto. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 62-5



**REDE TEMÁTICA EM ENGENHARIA DE MATERIAIS
UFOP - UEMG**

Pós-Graduação em Engenharia de Materiais



**“Preparação e caracterização de géis de alginato, quitosana
e nanoceluloses para aplicações biomédicas”**

Autor(a): Priscila de Freitas Siqueira Carvalho

Tese defendida e aprovada, em 27 de março de 2019, pela banca examinadora
constituída pelos professores:

Prof. Vagner Roberto Botaro (Doutor) – Orientador
Universidade Federal de São Carlos

Profª Augusta Cerceau Isaac Neta (Doutora)
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Breno Nonato de Melo (Doutor)
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Éder José Siqueira (Doutor)
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Igor José Boggione Santos (Doutor)
Universidade Federal de São João Del Rei

Profª Katia Monteiro Novack (Doutora) – Coorientadora
Universidade Federal de Ouro Preto

À minha família que, incondicionalmente, abriu mão dos próprios sonhos para que este meu se tornasse realidade!

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus! Minha fonte de inspiração que me capacitou e me segurou no colo, principalmente nos momentos em que mais fraquejei.

Ao meu marido, Gabriel, e ao meu filho, Joaquim, por compreenderem a minha ausência e me darem força para continuar o meu sonho. O amor de vocês me alimenta!

Aos meus pais, por me ajudarem a superar os obstáculos diários e não medirem esforços para me verem feliz! O meu amor eterno!

Aos meus irmãos, em especial ao Gilberto, por todas as contribuições e por sonhar comigo!

Ao Francisco e à Adriana que estiveram ao meu lado em todos os momentos... sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido! Gratidão!

À Ana Elza, minha filhinha, e ao Éder, meu irmão, meu amigo. Vocês são verdadeiros anjos em minha vida! Obrigada por toda parceira, dedicação, carinho e disponibilidade!

Ao professor Fabiano, por me acolher em seu laboratório e acreditar em meu potencial! Obrigada pelos ensinamentos, orientações e por todo o cuidado e atenção a mim despendidos durante este período!

Ao professor Vagner e à professora Kátia, amigos de longa data! Obrigada pelas orientações, contribuições e ensinamentos essenciais à minha formação!

Aos vários amigos dos diferentes laboratórios da UFMG, da UFSCAR-Sorocaba e do CTPM-BH que de alguma maneira contribuíram para a conclusão deste trabalho.

À CAPES pelo suporte financeiro.

PUBLICAÇÕES

- Artigo completo publicado em periódico – Qualis A1

SIQUEIRA, PRISCILA; SIQUEIRA, ÉDER; DE LIMA, ANA; SIQUEIRA, GILBERTO; PINZÓN-GARCIA, ANA; LOPES, ANA; SEGURA, MARIA; ISAAC, AUGUSTA; PEREIRA, FABIANO; BOTARO, VAGNER “*Three-Dimensional Stable Alginate-Nanocellulose Gels for Biomedical Applications: Towards Tunable Mechanical Properties and Cell Growing*”. *Nanomaterials*. , v.9, p.78 - , 2019.

- Trabalho publicado em anais de evento

SIQUEIRA, PRISCILA DE FREITAS; ELISEU, G.; LIMA, A. E.; SIQUEIRA, E. J.; BOTARO, V. R.; PEREIRA, F. V. “*Morphological, thermal and mechanical properties of alginate-oxidized nanocellulose gels for biomedical applications*”. In: Atlantic Basin Conference on Chemistry (ABCCChem), 2018, Cancun.

RESUMO

Os hidrogéis têm sido estudados como materiais promissores para diferentes aplicações biomédicas, seja em cicatrização de feridas, liberação controlada de medicamentos, ou como *scaffolds* para a medicina regenerativa. Neste trabalho foram preparados géis funcionais de alginato e nanoceluloses (com e sem modificação química) e géis de redes poliméricas semi-interpenetrantes (semi-IPNs) de alginato, quitosana e nanoceluloses. Os hidrogéis foram liofilizados e denominados géis. Os nanocristais de celulose (CNC) e CNC oxidado via reação mediada por 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila (TEMPO) foram obtidos a partir de hidrólise ácida da polpa de *Eucalyptus* branqueada; as nanofibras de celulose (NFC) e NFC oxidada via reação mediada por TEMPO (NFCT) foram obtidas a partir da desintegração mecânica da polpa de celulose. Estas nanoceluloses e os géis preparados foram caracterizados por diferentes técnicas como FTIR-ATR, DRX, MET, MEV, TGA, DMTA e microtomografia computadorizada de raios-X (micro-CT). A adição das nanoceluloses aos géis de alginato e aos géis semi-IPNs alginato/ quitosana, principalmente das NFCT, contribuiu para aumentar a estabilidade dimensional e o tamanho dos poros dos géis quando comparados àqueles sem nanoceluloses. Estas características são muito importantes para o transporte de nutrientes e crescimento celular. O desempenho mecânico dos materiais, de grande importância para as suas aplicações finais, foi melhorado a partir de um pós-tratamento térmico (a 80°C) para as amostras contendo NFCT. O aumento da temperatura também favoreceu as interações entre as cadeias dos polieletrólitos alginato e quitosana nos géis semi-IPNs alginato/ quitosana. Avaliou-se a citotoxicidade e o crescimento celular nos géis preparados utilizando-se o teste MTT (brometo de (4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio) tanto por contato direto das células de fibroblastos L929 com os géis, quanto pelo método do contato indireto. A adição das nanoceluloses, em especial das NFCT (50% m/m) aos géis contribuiu para a bioadesão e crescimento das células de fibroblastos nos novos materiais. As propriedades morfológicas, físico-químicas e mecânicas dos géis de alginato e nanoceluloses e dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses favoreceram a interação célula-material e a proliferação dos fibroblastos durante os 7 dias de cultura. A otimização da preparação destes materiais, com base nos procedimentos e resultados obtidos no presente trabalho, indica que os géis à base de nanoceluloses desenvolvidos são materiais interessantes e promissores para aplicações biomédicas.

Palavras-chave

Géis, viabilidade celular, propriedades mecânicas, biomateriais, nanotecnologia

ABSTRACT

Hydrogels have been studied as promising materials for biomedical applications mainly in tissue engineering as external bandages, drug carriers or scaffolds. The pure alginate gel, the alginate/nanocelluloses (unmodified and physicochemically modified) gels and the alginate/chitosan/nanocelluloses semi-interpenetrating polymer networks (semi-IPN's) were prepared and characterized in this work. The hydrogels were freeze-dried and called as gels. The cellulose nanocrystals (CNC) were obtained by acid hydrolysis of bleached *Eucalyptus* pulp. They were oxidized by 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) catalyzed oxidation reaction (CNCT). The cellulose nanofibers (CNF) and oxidized CNF were obtained by mechanical shearing of their aqueous suspensions. The oxidized CNF were also obtained by TEMPO catalyzed reaction (CNFT). The nanocelluloses and the prepared gels were characterized by analytical techniques as FTIR-ATR, XRD, TEM, SEM, TGA, DMTA and X-ray microtomography (micro-CT). The addition of nanocelluloses in alginate and in alginate/chitosan semi-IPNs gels, mainly the addition of CNFT, allows to increase their mechanical stability and pore sizes when compared to pure alginate gels, without nanocelluloses. These features are very important for nutrients transport and cell growth. The mechanical performance of these materials is an important parameter to enable some structural applications in human body. This property was further increased after a thermal post-treatment at 80°C of CNFT-based gels. The thermal post-treatment induces physicochemical interactions of alginate polyelectrolyte chains and chitosan in alginate/chitosan semi-IPN's gels. The cytotoxicity and cell growth tests of these gels were studied by MTT essays at direct and indirect contact (eluate method) of L929 fibroblast cells. The addition of nanocelluloses mainly CNFT at 50 wt% enables cell bioadhesion, cell growth, differentiation and proliferation on and in the alginate or alginate/chitosan-based gels. The morphological, physicochemical and mechanical properties of alginate/nanocelluloses gels and alginate/chitosan/nanocelluloses gels contributed to interactions of these materials and differentiation of fibroblast cells up to 7 days. The optimization of these materials preparation, based on the procedures and results obtained in this work, indicates that the developed nanocellulose-based gels are interesting and promising materials for biomedical applications.

Key-words

Gels, bioadhesion, thermal post-treatment, mechanical properties, biomaterials, nanotechnology

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
SUMÁRIO	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XVIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos específicos:	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 Géis	5
3.1.1 Géis para aplicações biomédicas	9
3.1.2 Géis de Alginato	12
3.1.2 Géis de Quitosana	17
3.2 Nanoceluloses	22
3.2.1 Modificações químicas em nanocelulose	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Materiais	31
4.2 Métodos	32
4.2.1 Extração, funcionalização e caracterização das nanoceluloses	32
4.2.2 Géis de alginato e nanoceluloses	35
4.2.3 Géis de alginato/ quitosana e nanoceluloses	37
4.2.4 Caracterização das nanoceluloses, dos géis de alginato e nanoceluloses e dos géis semi-IPNs de alginato/ quitosana e nanoceluloses	40

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO: GÉIS DE ALGINATO E NANOCELULOSES E GÉIS SEMI-IPNs ALGINATO/ QUITOSANA E NANOCELULOSES	48
5.1. Caracterização e funcionalização de nanoceluloses.....	48
5.2 Géis de alginato e nanoceluloses	59
5.2.1 Caracterização física, química e biológica dos géis de alginato e nanoceluloses	65
5.2.2 Propriedades morfológicas dos géis de alginato e nanoceluloses	73
5.3 Géis de alginato/ quitosana e nanoceluloses	93
5.3.1 Caracterização física, química e biológica dos géis semi-IPNs de alginato/ quitosana e nanoceluloses	98
5.3.2 Propriedades morfológicas dos géis de alginato e nanoceluloses	110
6. CONCLUSÕES	138
7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	141
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142
APÊNDICE	165

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Representação esquemática da formação de hidrogéis químicos e físicos. (Fonte: HOFFMAN, 2002; ALMEIDA, 2010 - adaptada).....	6
Figura 3.3: Estrutura química das regiões de blocos MM, GG e MG do polímero alginato. (Fonte: DRAGET <i>et al.</i> , 2005 - adaptada).....	12
Figura 3.4: Representação esquemática da reticulação iônica dos blocos gulurônicos do polímero alginato com íons cálcio. (Fonte: NASERI <i>et al.</i> , 2016 - adaptada).....	13
Figura 3.5: Desacetilação alcalina da quitina, geralmente na faixa de temperatura de 80° a 150°C. (Fonte: BRANT, 2008).	18
Figura 3.6: Representação esquemática de géis de quitosana ionicamente reticulados (a) PEC. (b) Reticuladores iônicos. (Fonte: BERGER <i>et al.</i> , 2004 – adaptada)	19
Figura 3.7: Representação esquemática da organização das microfibrilas de celulose. (Fonte: PÄÄKÖ <i>et al.</i> , 2007 - adaptada).....	23
Figura 3.8: Representação esquemática das nanoceluloses e imagens da sua morfologia - MEV dos CNC. (Fonte: FAVIER <i>et al.</i> , 1995); AFM das NFC (Fonte: HENRIKSSON <i>et al.</i> , 2007).	25
Figura 4.1: Representação esquemática da reação de oxidação mediada por TEMPO de nanoceluloses. (Fonte: ISOGAI <i>et al.</i> , 2011- adaptada).	34
Figura 5.1: Imagens iridescentes de dispersões de CNC em água, com concentração de aproximadamente 2% (m/v).....	49
Figura 5.2: Características morfológicas das amostras das nanoceluloses não modificadas e nanoceluloses TEMPO-oxidadas - imagens obtidas por MET dos CNCs (a); CNCT (b); NFCs (c); NFCT (d).....	50
Figura 5.3: Espectros de FTIR das nanoceluloses – CNC, CNCT, NFC e NFCT.....	52
Figura 5.4: Difratoograma das nanoceluloses - CNC, CNCT, NFC e NFCT.....	54
Figura 5.5: Curvas de TGA das nanoceluloses – CNC, CNCT, NFC e NFCT, em atmosfera de N ₂	56
Figura 5.6: Curvas de DTG das nanoceluloses – CNC, CNCT NFC e NFCT, em atmosfera de N ₂	56

Figura 5.7: Titulação condutimétrica para os CNCT e NFCT.....	58
Figura 5.8: Representação esquemática das possíveis interações entre as cadeias de alginato, as nanoceluloses e os íons Ca^{2+} presentes no sistema – reticulação iônica entre os grupos $-\text{COO}-$ das cadeias de alginato e íons Ca^{2+} (a); reticulação iônica entre os grupos $-\text{COO}-$ das cadeias de alginato e das nanoceluloses TEMPO-oxidadas e íons Ca^{2+} (b); ligações de hidrogênio entre as cadeias das nanoceluloses (c).....	60
O tipo de nanocelulose (NFC, NFCT, CNC e CNCT) adicionada ao sistema e a concentração das mesmas influenciaram na estabilidade dimensional dos géis de alginato e o estudo dessa propriedade, importante para diversas aplicações, encontra-se decrito a seguir.....	61
Figura 5.9: Representação esquemática dos géis de alginato e nanoceluloses TEMPO-oxidadas.	61
Figura 5.10: Imagem dos géis de alginato e nanoceluloses sem modificação química e nanocelulose TEMPO-oxidadas - Alg_NFC36 (a), Alg_NFCT36 (b), Alg_CNC36 (c) e Alg_CNCT36 (d).	62
Figura 5.11: Imagem dos géis Alg_NFCT10 (a) e Alg_CNCT10 (b).	64
Figura 5.12: Representação esquemática de uma rede de percolação de CNC. Os bastões vermelhos correspondem aos CNC em redes percoladas e os bastões verdes aos CNC que não estão em redes de percolação. (Adaptada – DUFRESNE, 2012).....	65
Figura 5.13: Espectros de FTIR- ATR para o polímero alginato de sódio, gel de alginato puro (Alg_ Ca^{2+}) e géis de alginato e nanoceluloses (Alg_CNC36; Alg_CNCT36; Alg_NFC36; Alg_NFCT36).....	66
Figura 5.14: Difratoograma do gel Alg_ Ca^{2+} .	67
Figura 5.15: Difratoograma dos géis de alginato e nanoceluloses (Alg_ Ca^{2+} ; Alg_CNC36; Alg_CNCT36; Alg_NFC36; Alg_NFCT36).	68
Figura 5.16: Curvas de TGA dos géis de alginato e alginato e nanoceluloses (36%), em atmosfera de N_2 .	70
Figura 5.17: Curvas de DTG do gel de alginato puro e dos géis de alginato e nanoceluloses (36% m/m) – Alg_CNC36 e Alg_CNCT36 (a); Alg_NFC36 e Alg_NFCT36 (b).	70
Figura 5.18: Curvas de TGA dos géis de alginato e nanoceluloses, em diferentes concentrações (10, 36 e 50% m/m), em atmosfera de N_2 – alginato e CNC (a); alginato e CNCT (b); alginato e NFC (c); alginato e NFCT (d).	72

Figura 5.19: Caracterização morfológica do gel de alginato puro (Alg_Ca ²⁺) (a) e géis de alginato e nanoceluloses (50% m/m) - Alg_CNC50 (b); Alg_CNCT50 (c); Alg_NFC50 (d); Alg_NFCT50 (e) com magnificação de 500 x. As inserções representam uma magnificação de 1500 x (a, b, d, e) e 3500 x (c).	74
Figura 5.20: Imagens de microtomografia de raios-X do gel de alginato e CNCT 50% (m/m) - Seções transversais da amostra (a - b); volume da amostra exibindo arranjo de sua parede em 3D (c). 76	76
Figura 5.21: Imagens de microtomografia de raios-X do gel de alginato e NFCT 50% (m/m) - seções transversais da amostra (a - b); volume da amostra exibindo arranjo de sua parede em 3D (c). 76	76
Figura 5.22: Mapas da espessura das paredes dos poros dos géis de alginato e CNCT 50% (m/m) (a); e alginato e NFCT 50% (m/m) (b). A legenda e a barra de escala estão em microns. ...	77
Figura 5.23: Ganho de massa do gel de alginato (Alg_Ca ²⁺) em função do tempo, a 25°C e 37°C, em H ₂ O milli-Q (pH 6,2) e em PBS pH 7,4.....	78
Figura 5.24: Módulo de armazenamento do gel de alginato (Alg_Ca ²⁺) em dois ciclos de aquecimento (a); valores de Tan δ em função da temperatura (ciclos 1 e 2) (b).....	84
Figura 5.25: Módulo de armazenamento do gel de alginato e NFCT 50% (m/m) (Alg_NFCT50) sem tratamento térmico e após tratamento térmico, a 80°C.	87
Figura 5.26: Ensaio MTT de fibroblastos L929 semeados no gel de alginato puro (Alg_Ca ²⁺) e nos géis de alginato e nanoceluloses (50% m/m) (Alg_CNCT50 e Alg_NFCT50). Ensaio de contato direto - citotoxicidade e proliferação celular avaliadas após 24, 48, 72 e 96 horas (a); ensaio de contato indireto (eluato por 48h) citotoxicidade e proliferação celular avaliadas após 24, 48, 72 e 96 horas (b). Os dados representam a média ± desvio padrão de seis repetições para cada material (n = 6).	89
Figura 5.27. Micrografias MEV de células de fibroblastos L929 semeadas no gel de alginato e nanofibra de celulose TEMPO-oxidada (50% m/m) – Alg_CNFT50: 2 dias de incubação com magnificação de 4000 x (a) e 6000 x (b); 4 dias de incubação com magnificação de 4000 x (c) e 6000 x (d); 7 dias de incubação com magnificação de 6000 x (e) e 10000 x (f).	92
Figura 5.30: Imagem dos géis Alg_Qui_CNCT50 (a) e Alg_Qui_NFCT50 (b)	98
Figura 5.31: Imagem dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses 10% (m/m) – Alg_Qui_CNCT10 (a) e Alg_Qui_NFCT10 (b).	99

Figura 5.32: Espectros de FTIR-ATR da quitosana e do alginato utilizados para a obtenção dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses.	101
Figura 5.33: Espectros de FTIR-ATR para os géis semi-IPNs de alginato/ quitosana (Alg_Qui) e alginato/ quitosana e nanoceluloses modificadas e sem modificações químicas (Alg_Qui_CNC36; Alg_Qui_CNCT36; Alg_Qui_NFC36; Alg_Qui_NFCT36).	103
Figura 5.34: Difratoograma dos reagentes alginato e quitosana.	104
Figura 5.35: Difratoograma do gel semi-IPN alginato/ quitosana (Alg_Qui) e dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses 50% (m/m) - Alg_Qui_CNC50; Alg_Qui_CNCT50; Alg_Qui_NFC50; Alg_Qui_NFCT50.....	105
Figura 5.36: Curvas de TGA dos géis semi-IPNs alginato/quitosana e alginato/ quitosana e nanoceluloses (36% m/m) em atmosfera de N ₂	107
Figura 5.37: Curvas de DTG dos géis semi-IPNs alginato/quitosana e alginato/ quitosana e nanoceluloses (36% m/m) em atmosfera de N ₂ – Alg_Qui_CNC36 e Alg_Qui_CNCT36 (a); Alg_Qui_NFC36 e Alg_Qui_NFCT36 (b).	107
Figura 5.38: Curvas de TGA dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses em diferentes concentrações (10, 36 e 50% m/m), em atmosfera de N ₂	109
Figura 5.39 Caracterização morfológica do gel semi-IPN alginato/ quitosana (Alg_Qui) (a); e dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (50% m/m) - Alg_Qui_CNC50 (b); Alg_Qui_CNCT50 (c); Alg_Qui_NFC50 (d); Alg_Qui_NFCT50 (e). Magnificação de 500 x. As inserções representam uma magnificação de 1000 x.	111
Figura 5.40: Imagens de microtomografia de raios-X do gel semi-IPN alginato/ quitosana e CNCT 50% (m/m) - Seções transversais da amostra (a - b); volume da amostra exibindo arranjo de sua parede em 3D (c).	113
Figura 5.42: Mapas da espessura das paredes dos poros dos géis semi-IPNS alginato/ quitosana e CNCT 50% (m/m) (a); e alginato/ quitosana e NFCT 50% (m/m) (b). A legenda e a barra de escala estão em microns.....	114
Figura 5.43: Ganho de massa do gel semi-IPN alginato/ quitosana e nanocelulose (36% m/m) (Alg_Qui_CNC36) em função do tempo, em PBS, pH 7,4, a 25°C e 37°C.....	117

Figura 5.44: Grau de inchamento dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses 36% (m/m): Alg_Qui_CNC36; Alg_Qui_CNCT36; Alg_Qui_NFC36; Alg_Qui_NFCT36; Alg_Qui, em diferentes valores de pH.....	119
Figura 5.45: Efeito do pH na estrutura e no grau de inchamento de géis semi-IPN quitosana e alginato. Os círculos representam as interações iônicas entre as cargas negativas (-) do alginato e as cargas positivas da quitosana (+). (Adaptado - BERGER <i>et al.</i> , 2004).	120
Figura 5.46: Análise de TMA para os géis semi-IPNs alginato/ quitosana sem adição de nanoceluloses (a) e para os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (36 e 50% m/m) (b-e) – Temperatura de transição vítrea em dois ciclos de aquecimento, sendo (1) para o primeiro ciclo e (2) para o segundo ciclo de aquecimento.....	124
Figura 5.47: Módulo de armazenamento (E'_{2}) dos géis Alg_Qui_CNC50, Alg_Qui_CNCT50, Alg_Qui_NFC50 e Alg_Qui_NFCT50 em um segundo ciclo de aquecimento.....	127
Figura 5.48: Ensaio MTT de fibroblastos L929 semeados no gel semi-IPN alginato/ quitosana (Alg_Qui) e nos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (50% m/m) (Alg_Qui_CNCT50 e Alg_Qui_NFCT50). Ensaio do contato direto - citotoxicidade e proliferação celular avaliadas após 24, 48, 72 e 96 horas. Os dados representam a média \pm desvio padrão de seis repetições para cada material (n = 6).....	130
Figura 5.49: Ensaio MTT de fibroblastos L929 semeados no gel semi-IPN alginato/ quitosana (Alg_Qui) e nos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (50% m/m) (Alg_Qui_CNCT50 e Alg_Qui_NFCT50). Ensaio do contato indireto (eluato por 48h) citotoxicidade e proliferação celular avaliadas após 24, 48, 72 e 96 horas. Os dados representam a média \pm desvio padrão de seis repetições para cada material (n = 6).	132
Figura 5.50. Micrografias MEV de células de fibroblastos L929 semeadas no gel semi-IPN alginato/ quitosana (Alg_Qui) após 2 dias de incubação (a-b), 4 dias de incubação (c-d) e 7 dias de incubação (e-f).....	133
Figura 5.51. Micrografias MEV de células de fibroblastos L929 semeadas no gel semi-IPN alginato/ quitosana e CNCT (50% m/m) – Alg_Qui_CNCT50 após 2 dias de incubação (a-b), 4 dias de incubação (c-d) e 7 dias de incubação (e-f).	134

Figura 5.52. Micrografias MEV de células de fibroblastos L929 semeadas no gel semi-IPN alginato/ quitosana e NFCT (50% m/m) –Alg_Qui_NFCT50 após 2 dias de incubação (a-b), 4 dias de incubação (c-d) e 7 dias de incubação (e-f). 135

Figura X.1: Variação do fluxo de calor em função da temperatura para a quitosana – (a) curva de DSC na faixa de temperatura entre 45 e 200°C; (b) aplicação do DSC na faixa de temperatura entre 45 e 80°C..... 165

Figura X.2: Curvas de TGA do gel de alginato e NFCT (50% m/m) sem tratamento térmico e após tratamento em estufa, a 80°C, por 1 hora e por 4h..... 166

LISTA DE TABELAS

Tabela IV.1: Reagentes para as sínteses dos géis de alginato e nanoceluloses	36
Tabela IV.2: Reagentes para as sínteses dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses	39
Tabela IV. 3: Valores de temperatura e pH utilizados nos ensaios de inchamento dos géis de alginato e nanoceluloses e géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses.....	43
Tabela V.2: Índices de cristalinidade dos CNC, CNCT, NFC e NFCT através dos espectros de DRX.	55
Tabela V.3: Volumes de NaOH (0,01mol/L) consumidos durante a titulação condutimétrica das nanoceluloses TEMPO-oxidadas, valores das massas de nanoceluloses seca utilizadas nos ensaios e grau de oxidação (GO) das NFCT e CNCT.	59
Tabela V.4: Ganho de massa máximo após ensaio de inchamento (2h; 37°C em água milli-Q e em PBS, pH 7,4) para os géis de alginato e nanoceluloses.....	80
Tabela V.5: Módulo de armazenamento ($E'1$ e $E'2$) dos géis Alg_NFC, Alg_NFCT, Alg_CNC e Alg_CNCT, com diferentes concentrações das nanoceluloses (36 e 50% m/m), na faixa de temperatura corporal (35, 37 e 42°C).....	85
Tabela V.6: Ganho de massa máximo após ensaio de inchamento (2h; 37°C em água milli-Q e em PBS, pH 7,4) para os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses.....	118
Tabela V.7: Módulo de armazenamento ($E'1$ e $E'2$) dos géis Alg_Qui (sem adição de nanoceluloses) e Alg_Qui_CNC50, Alg_Qui_CNCT50, Alg_Qui_NFC50, Alg_Qui_NFCT50, na faixa de temperatura corporal (35, 37 e 42°C).....	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Alg_Ca²⁺: gel de alginato reticulado com cálcio

Alg_CNC: gel de alginato e CNC

Alg_CNCT: gel de alginato e CNCT

Alg_NFC: gel de alginato e NFC

Alg_NFCT: gel de alginato e NFCT

Alg_Qui: gel de alginato e quitosana

Alg_Qui_CNC: gel de alginato, quitosana e CNC

Alg_Qui_CNCT: gel de alginato, quitosana e CNCT

Alg_Qui_NFC: gel de alginato, quitosana e NFC

Alg_Qui_NFCT: gel de alginato, quitosana e NFCT

AFM: microscopia de força atômica

CB: celulose bacteriana

CNC: nanocristais de celulose

CNCT: nanocristais de celulose oxidados com TEMPO

D: diâmetro

DMEM: dulbecco medium eagle's high glucose

DMTA: análises termodinâmico-mecânicas

DTG: derivada da curva termogravimétrica

DRX: difração de raios-X

E': módulo de armazenamento

E_1' : módulo de armazenamento para o primeiro ciclo de aquecimento

E_2' : módulo de armazenamento para o segundo ciclo de aquecimento

FBS: soro fetal bovino

FTIR- ATR: Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de *Fourier* e Reflexão Total Atenuada

GD: grau de desacetilação

GO: grau de oxidação

I_c : índice de cristalinidade

IPNs: rede de polímeros interpenetrantes

L: comprimento

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

Micro-CT: microtomografia computadorizada de raios-X.

MTT: brometo de (4,5-dimetiltiazolil-2) -2,5-difeniltetrazólio

NFC: nanofibras de celulose

NFCT: nanofibras de celulose oxidadas com TEMPO

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PEC: polieletrólitos complexos

SDS: dodecil sulfato de sódio

semi-IPNs: rede de polímeros semi-interpenetrantes

$\tan \delta$: relação entre as variações nos módulos de perda e armazenamento de energia

TEMPO: 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila

Tg: temperatura de transição vítrea

TGA: Análise Termogravimétrica

V: volume

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que muitos processos de cultura celular realizados em materiais planos são atraentes por sua simplicidade, porém não representam os ambientes *in vivo*: são sistemas de cultura tipicamente bidimensionais (2D), enquanto que as células no corpo são suscetíveis a receberem sinais em todas as três dimensões. Os géis, quando comparados aos substratos de cultura convencionais, apresentam uma maior aplicabilidade e revelam fenômenos fundamentais que regulam o comportamento celular, tais como expansão e diferenciação dirigida de vários tipos de células (CALIARI e BURDICK, 2016). Também são muito utilizados em sistema de liberação de fármacos, fazendo-se presentes em diversos ramos da medicina, incluindo cardiologia, oncologia, cicatrização de feridas e gestão da dor (LI e MOONEY, 2016).

Hidrogéis, ou simplesmente géis, são redes poliméricas tridimensionais, capazes de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos sem se dissolverem (PEPPAS *et al.*, 2000). Destacam-se por suas propriedades como hidrofiliabilidade, alta permeabilidade de metabólitos e oxigênio (HENNINK *et al.*, 2002). Em geral são biocompatíveis, apresentam baixa citotoxicidade e seu alto teor de água lhes confere uma similaridade estrutural com a matriz extracelular (FRAMPTON, 2011; MARKSTEDT *et al.*, 2015), sendo, portanto, de grande interesse na área biomédica.

Os géis podem ser fabricados a partir de polímeros sintéticos como poli (etilenoglicol), poli (metacrilato de hidroxietila) ou de polímeros naturais, como por exemplo, colágeno, ácido hialurônico, alginato, quitosana, acetato de celulose (JODDAR *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2005; SENNA e BOTARO, 2017). Além disso, diferentes funções podem ser facilmente incorporadas às redes de ligações cruzadas, física ou quimicamente, para produzir "materiais inteligentes", que apresentam diferentes respostas às mudanças nas condições externas, tais como temperatura, pH, força iônica e campo elétrico (PENG *et al.*, 2011).

Porém, características físicas dos géis como estabilidade dimensional, resistência mecânica, grau de inchamento, dentre outras, são de suma importância para a aplicação em cultura celular. As propriedades mecânicas lhes garantem estabilidade física e podem também influenciar a mecanotransdução celular, que por sua vez, tem consequências na propagação, migração e diferenciação de células-tronco, por exemplo (INGBER, 2006; CALIARI e BURDICK, 2016).

Diversas abordagens estão sendo investigadas para síntese de biomateriais com melhor regeneração tecidual (YILDIRIM *et al.*, 2008). Alginato, um polissacarídeo derivado de algas marrons, constituído por várias unidades de sais de ácido β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G) unidas por ligações glicosídicas (SOUZA *et al.*, 2008), é um poliânion frequentemente usado na formulação de géis. Esses géis (à base de alginato) são de grande relevância na área biomédica, devido à sua interessante capacidade de formar géis através de mecanismos de reticulação iônica com cátions divalentes, como cálcio. Os géis de alginato apresentam características favoráveis para envolver células e regenerar tecidos (CALIARI e BURDICK, 2016) e possuem propriedades de autocura (YANG *et al.*, 2013). Porém, muitas vezes apresentam baixa resistência mecânica e estabilidade dimensional, além de limitada capacidade de adesão celular (ELBERT, 2011; JODDAR *et al.*, 2016). Géis de alginato reticulados covalentemente (géis químicos) apresentam estruturas mecanicamente mais estáveis (JUNGST *et al.*, 2016), mas têm algumas propriedades comprometidas, como a sua biocompatibilidade (ZHANG *et al.*, 2015) e biodegradabilidade. Nanopartículas como nanoargila e zeólitas (FERNANDES *et al.*, 2017) e nanotubos de carbono (JODDAR *et al.*, 2016) também têm sido estudadas como agentes de reforço para géis de alginato, mas também apresentam limitações para aplicações na área médica.

A adição de nanoceluloses em géis de alginato foi reportada por Lin *et al.* (2012) e De France *et al.* (2017) como alternativa para melhorias nas suas propriedades mecânicas. No entanto, géis de alginato que combinem propriedades mecânicas e estabilidade dimensional, sem comprometer a sua porosidade e capacidade de absorver água e outros fluidos biológicos, essenciais para o crescimento e fixação das células, ainda não foram apresentados na literatura.

A combinação de dois ou mais polímeros, onde pelo menos um deles é reticulado (na presença do outro) formando redes interpenetrantes ou semi-interpenetrantes (NASERI *et al.*, 2016), também tem

vido estudada como uma alternativa para melhorias nas propriedades mecânicas e biológicas dos géis de alginato. A quitosana, um polímero catiônico natural, de superfície hidrofílica e capaz de promover a adesão, proliferação e diferenciação celular (LI *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2012), é um dos principais compostos empregados na síntese de hidrogéis, juntamente com o alginato (MENDES *et al.*, 2008). Os complexos polieletrólíticos de quitosana e alginato são formados com o objetivo de se obter hidrogéis mais versáteis, com diferentes estruturas químicas e físicas, para uma melhor aplicabilidade, principalmente na área biomédica (GABROVSKA *et al.*, 2008). Porém, sua estrutura é mantida por interações iônicas que são fortemente suscetíveis ao pH do meio reacional (BERGER *et al.*, 2004), influenciando, conseqüentemente, nas propriedades finais dos mesmos.

Sendo assim, no presente trabalho foram estudados géis funcionais de alginato e nanoceluloses (com e sem modificação química) e géis de redes poliméricas semi-interpenetrantes (semi-IPNs) de alginato quitosana e nanoceluloses. Avaliou-se os efeitos de adição das nanoceluloses e de uma possível reticulação adicional, termicamente induzida, nas propriedades mecânicas dos géis. Discutiu-se a correlação entre a composição química dos polímeros alginato e quitosana e a morfologia das nanoceluloses nas propriedades finais dos géis. Estudou-se sobre a sua citocompatibilidade e capacidade de bioadesão e proliferação celular, a fim de se avaliar o potencial dos novos materiais para aplicações em medicina regenerativa e cicatrização de feridas.

CAPÍTULO 2

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência de nanoceluloses (nanocristais e nanofibras) na síntese de novos géis funcionais de alginato e alginato/ quitosana para aplicações biomédicas.

2.2 Objetivos específicos:

- Extrair, caracterizar e avaliar as propriedades superficiais de nanoceluloses extraídas de polpa Kraft branqueada de *Eucalyptus*.
- Funcionalizar, a partir de modificação química superficial dos grupos hidroxilas, nanofibras e nanocristais de celulose e avaliar a influência da sua morfologia na síntese dos géis.
- Sintetizar e caracterizar géis de alginato e nanoceluloses e géis semi-IPNs de alginato/ quitosana e nanoceluloses (com e sem modificação química).
- Avaliar as propriedades mecânicas e biológicas dos novos materiais, visando possíveis aplicações em engenharia de tecidos.

CAPÍTULO 3

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Géis

Géis são materiais poliméricos de elevada massa molar, obtidos a partir de monômeros capazes de formar ligações cruzadas entre si, conhecidas como reticulações (QUEIROZ, 2012). Expandem quando imersos em solvente específico e, devido à presença de interações intermoleculares formadas por ligações covalentes, entrelaçamento físico, complexos iônicos, ligações de hidrogênio (Peppas, 1987), interações de van der Waals e/ou interações hidrofílicas, não se dissolvem, restando o solvente dentro de sua estrutura tridimensional (SILVA, 2006). Os géis poliméricos capazes de absorver água são designados hidrogéis.

Segundo Karadag *et al.* (2002), os hidrogéis representam uma classe importante de materiais poliméricos. Possuem grupos hidrofílicos que retêm, dentro de sua estrutura, uma grande quantidade de água (QUEIROZ, 2010). Uma vez inchados, as propriedades dos hidrogéis são influenciadas em grande parte pelo teor de água em seu interior que, frequentemente, excede 100% de sua massa em volume (KIM *et al.*, 2003). Os hidrogéis têm suas moléculas poliméricas hidrofílicas reticuladas por ligações químicas (HOFFMAN, 2002) ou outras forças coesivas como interações iônicas, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. Podem ser quimicamente estáveis ou podem degradar e, eventualmente desintegrar e dissolver (HOFFMAN, 2002). São as ligações cruzadas que conferem a estrutura de rede e a integridade física do material (LANGER e PEPPAS, 2003).

Os hidrogéis são considerados géis reversíveis ou géis físicos quando a rede é mantida unida por entrelaçamento molecular e/ou forças de interação secundárias. São considerados géis permanentes ou químicos quando formam redes covalentemente reticuladas (HOFFMAN, 2002; SENNA e BOTARO, 2017). Estes últimos podem ser produtos de reticulação de polímeros solúveis em água com outros materiais ou da conversão de polímeros hidrofóbicos em hidrofílicos através de reações

de reticulação de forma a originar uma rede polimérica (ALMEIDA, 2010). A Figura 3.1 apresenta, esquematicamente, a formação de hidrogéis (físico e químico) a partir da modificação química de um polímero hidrofóbico.

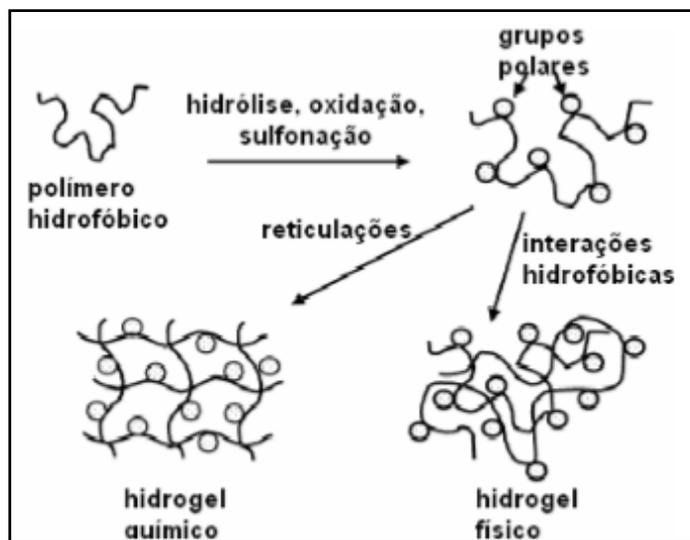


Figura 3.1: Representação esquemática da formação de hidrogéis químicos e físicos. (Fonte: HOFFMAN, 2002; ALMEIDA, 2010 - adaptada).

Os géis também podem ser classificados em relação à possibilidade de se formar redes poliméricas. A combinação de polímeros, a fim de se obter ou ressaltar alguma característica específica, é chamada de redes de polímeros interpenetrantes (IPNs) ou rede de polímeros semi-interpenetrantes (semi-IPNs). A rede de polímeros interpenetrantes é formada a partir de dois ou mais polímeros ou a partir de um conjunto de monômeros que se entrelaçam a nível molecular. As estruturas formadas só podem ser separadas via reação química. Já a rede de polímeros semi-IPN é formada a partir de dois ou mais polímeros lineares ou ramificados caracterizando um entrelaçamento com interações mais fracas, geralmente usa-se o reticulante de apenas um polímero. Assim, estes podem ser separados sem envolver quebras de ligação química (MATRICARD *et al.*, 2013). A Figura 3.2 representa, esquematicamente, géis IPNs (a) e semi-IPNs (b).

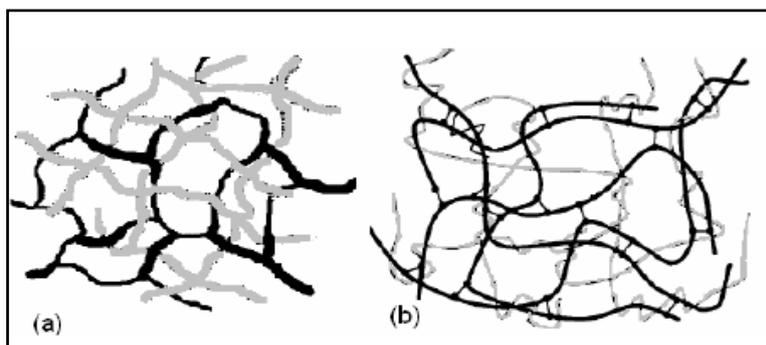


Figura 3.2: Representação esquemática de redes de polímeros IPNs (a) e semi-IPNs (b). (Fonte: ABREU *et al.*, 2008 - adaptada).

As redes IPNs ou semi-IPNs têm sido relatadas como uma interessante alternativa para materiais com aplicações em engenharia de tecidos, em função do alto estresse necessário e dos baixos desempenhos mecânicos apresentados pelos hidrogéis (NASERI *et al.*, 2016). Os hidrogéis multicomponentes, baseados em IPNs ou semi-IPNs, têm apresentado significativo aumento no desempenho mecânico de tecidos “moles” artificiais, portadores de carga, como a cartilagem artificial (CHUNG *et al.*, 2011). Além disso, dependendo da natureza dos polímeros envolvidos, as redes IPNs ou semi-IPNs podem formar hidrogéis bioadesivos, biocompatíveis, dentre outras (MATRICARD *et al.*, 2013). No campo farmacêutico, especialmente em liberação controlada de drogas, as IPNs também têm atraído considerável atenção (LOHANI *et al.*, 2014).

Porém, Peppas *et al.* (2000) afirmam que a capacidade de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos é a principal propriedade de um hidrogel visando aplicações médico-farmacêuticas. A maioria de suas outras propriedades, como capacidade de sorção, cinética de expansão, permeabilidade a solutos dissolvidos, propriedades superficiais (adesividade), características mecânicas e propriedades óticas, é diretamente influenciada por esta. Quando um hidrogel seco inicia o seu processo de absorção de água, as primeiras moléculas por ele absorvidas irão hidratar as moléculas mais polares da estrutura polimérica, levando a um primeiro tipo de ligação da água com as moléculas do polímero. À medida que estes grupos vão sendo hidratados, ocorre o aumento físico da estrutura polimérica, havendo uma exposição das moléculas mais hidrofóbicas da matriz

polimérica. Estas moléculas interagem com as moléculas de água, levando ao aparecimento de um segundo tipo de interação entre as moléculas de água e os componentes mais hidrofóbicos do polímero. Por fim, ocorre um terceiro método para a hidratação dos géis em função da difusão osmótica entre as cadeias. A todo este processo, opõem-se as forças covalentes e as reticulações físicas que mantêm a estrutura do hidrogel. Deste modo, o equilíbrio entre as forças de absorção e retenção de água e as de estrutura do hidrogel permitem que se atinja o equilíbrio em relação à quantidade máxima de água absorvida pelo material (HENNINK e NOSTRUM, 2002; ALMEIDA, 2010).

Muitos estudos estão sendo realizados a respeito do grau de expansão de um gel, uma vez que essa variação de volume pode ser induzida não só pelo solvente, mas também por mudanças no ambiente em que este se encontra: temperatura, pH, composição do solvente, tensão mecânica, campo elétrico e luz (LANGER e PEPPAS, 2003). Os géis que possuem essa transição de fases em resposta a um estímulo externo são conhecidos como géis responsivos e podem ser utilizados em diversas áreas: desde a agricultura, como substitutos do solo, à área dos biomateriais (PARK, 1993), sistemas de liberação controlada de medicamentos e imobilização de enzimas (GABROVSKA *et al.*, 2008). Ressalta-se que os hidrogéis com comportamento diferenciado em função do pH contêm grupos ácidos ou básicos e em meio aquoso, com pH e força iônica adequados, estes grupos podem ionizar, desenvolvendo cargas fixas no gel (LANGER e PEPPAS, 2003).

É importante salientar também que a extensão do inchamento do gel depende das interações entre as cadeias poliméricas reticuladas com o solvente e da sua força elástica. Sabendo que algumas alterações no organismo (pH, temperatura ou concentração de substâncias) podem ser ocasionadas por manifestações de doenças (LANGER E PEPPAS, 2003), géis com grupos funcionais específicos (tais como aminas e ácidos carboxílicos) são alternativas de grande relevância na preparação de formas farmacêuticas. Permitem a liberação do fármaco após expansão, mediante contato com o meio de dissolução ou em resposta a estímulos fisiológicos como temperatura, pH, enzimas, biomoléculas (glicose, ureia, insulina), força iônica e oxidação (LIN e METTERS, 2006). Além disso, também podem apresentar outras propriedades que favorecem o uso como biomateriais: natureza elástica (semelhante à dos tecidos naturais), alta permeabilidade a metabólitos e oxigênio (HENNINK *et al.*,

2002), baixa citotoxicidade, biocompatibilidade, sendo, portanto, de grande interesse na área biomédica.

3.1.1 Géis para aplicações biomédicas

Biomateriais são descritos como materiais de origem natural ou sintética, que podem ser utilizados ou adaptados para uso médico, implicando a sua interação com sistemas biológicos (ALMEIDA, 2010). Um biomaterial deve apresentar características tais como biocompatibilidade, biofuncionalidade, biodegradabilidade, permeabilidade a nutrientes e troca de gases, porosidade que permita a penetração celular e formação de tecido, superfície apropriada para adesão celular, além de transportar e transmitir sinais biomoleculares (PALSSON e BHATIA, 2003; RECOUVREUX, 2008).

Os materiais poliméricos são citados como os biomateriais de maior utilização, se comparados aos cerâmicos e metais, em função da facilidade de preparação e biocompatibilidade, com aplicações diversas, a citar ortopedia, cardiologia e em sistemas de liberação controlada (WU *et al.*, 2005). Em trabalho de revisão, Langer (2003) ressalta a importância dos polímeros como biomateriais e sua utilização em sistemas de liberação de fármacos e proteínas, como *scaffold* em engenharia de tecidos e em nanotecnologia.

Almeida (2010) citando vários autores descreve sobre a história dos hidrogéis como biomateriais: Wichterle e Lim, nos anos 60, prepararam hidrogéis de metacrilato de hidroxietila (WICHTERLE e LIM, 1960); na década de 80, estudos realizados por Lim e Sun (1980) demonstraram a aplicação de microcápsulas de alginato de sódio no encapsulamento de células e a possibilidade de incorporação de outros polímeros naturais e de cartilagens em hidrogéis para aplicações em queimaduras foi demonstrada por Yannas *et al.* (1989). Desde então, hidrogéis de polímeros naturais como quitosana (SENEL *et al.*, 2000; TORRADO *et al.*, 2004), pectina (MUNIZ *et al.*, 2000) e gelatina (LOPES *et al.*, 2003) ou sintéticos, como poliuretano (JEEVANANDA *et al.*, 2003), ácido poliacrílico (MAHDAVINIA *et al.*, 2004), poliacrilonitrila (SAHINER *et al.*, 1998), poliacrilamida (AGNIHOTRI *et al.*, 2005) e poli(N-isopropilacrilamida) (MAOLIN *et al.*, 2000), têm sido utilizados como biomateriais em diversas aplicações, a citar engenharia de tecidos para regeneração e reparação

de órgãos e em sistemas de liberação controlada de fármacos em locais específicos do corpo. Almeida (2010) também destaca em seus trabalhos a importância do alginato na síntese de hidrogéis para aplicações biomédicas, devido a sua facilidade em gelificar e à elevada biocompatibilidade. Czaja *et al.* (2007) relatam avanços na área de biomateriais e aplicações de vários polissacarídeos em biomedicina e em engenharia de tecidos, citando, também, alginato e quitosana como materiais promissores.

Takahashi (2014) afirma que o crescente interesse em hidrogéis para aplicação em biomedicina é justificado por suas características semelhantes ao tecido vivo. A comparação é atribuída à capacidade do hidrogel absorver e reter grande quantidade de água, à elasticidade da cadeia polimérica que o compõe e por muitos apresentarem biocompatibilidade (BELL e PEPPAS, 1995). Além disso, muitos hidrogéis exibem uma baixa tensão interfacial com os fluidos biológicos e tecidos e apresentam similaridade nas propriedades hidrodinâmicas de géis naturais biológicos, células e tecidos. Sua natureza elastomérica minimiza a irritação mecânica e de fricção ao tecido das vizinhanças, não causa dor nem danos à mucosa ou ao interior dos vasos sanguíneos, sem risco de infecção (PARK, 1993).

Em engenharia de tecidos, os hidrogéis se destacam, também, em função da sua capacidade de encapsular células e pequenos tecidos, mantendo a integridade e a proliferação dessas células no sítio de ação (MATRICARD *et al.*, 2013). Para imobilização de enzimas e proteínas, os hidrogéis funcionam como matrizes que permitem a passagem de substratos e outros produtos que irão interagir com os materiais imobilizados (TAQUIEDDIN e AMIJI, 2008). Li e Mooney (2016) afirmam que os hidrogéis também podem proporcionar controle espacial e temporal sobre a liberação de vários agentes terapêuticos. Devido às suas propriedades físicas ajustáveis, degradabilidade controlável e capacidade de proteger fármacos lábeis da degradação, os hidrogéis servem como uma plataforma na qual ocorrem várias interações físico-químicas com as drogas encapsuladas para controlar a liberação do fármaco.

Dentre as várias macromoléculas usadas para a síntese de hidrogéis, os polissacarídeos são particularmente vantajosos em comparação aos polímeros sintéticos, devido as suas propriedades econômicas, biocompatibilidade, biodegradabilidade, elevada hidrofiliabilidade dentre outros (PENG *et*

al., 2011). Dumitriu *et al.* (1996) também já citavam dextrano, quitosana, ácido hialurônico, alginato e celulose como exemplos de polissacarídeos utilizados na preparação de biomateriais.

Porém, para serem utilizados na prática médica, os biomateriais precisam apresentar propriedades mecânicas e morfológicas adequadas e capacidade de induzir a formação de um novo tecido (GINEBRA *et al.*, 1996). Caliari e Burdick (2016) destacam a importância das propriedades mecânicas dos hidrogéis para a estabilidade do material para cultura e para a mecanotransdução celular. Li e Mooney (2016) descrevem sobre a importância do tamanho dos poros e da resistência mecânica dos hidrogéis na área médica/ farmacêutica: o tamanho dos poros do hidrogel controla, por exemplo, a difusão e a liberação de drogas, uma vez que controla as interações entre os fármacos e a rede de polímeros. NAFEA *et al.* (2011) falam sobre a importância da tenacidade de um hidrogel para manter a sua estrutura e evitar a fratura durante o uso e após a adesão do tecido. Especialmente quando se utilizam hidrogéis como membranas imuno-isolantes: a matriz de hidrogel precisa ser resistente o suficiente para resistir à ruptura e evitar a fuga celular e os riscos associados. Li e Mooney (2016) ressaltam a necessidade da bioadesão e resistência mecânica dos hidrogéis para aplicações biomédicas: as barreiras biológicas tais como o epitélio intestinal e a mucosa são frequentemente dinâmicos e escorregadios, limitando a capacidade de muitos hidrogéis de aderir. Um hidrogel que pode aderir bem ao epitélio pode prolongar a retenção do sistema num local alvo e assim proporcionar uma dose de fármaco suficiente para o efeito terapêutico desejado, por exemplo.

Há, aproximadamente, duas décadas, esforços extensivos têm sido feitos para desenvolver hidrogéis bioadesivos para permitir uma melhor aplicabilidade em biomedicina (PEPPAS e SAHLIN, 1996). Bhattarai *et al.* (2010) verificaram que alguns polímeros tais como a quitosana são mucoadesivos, em função das possíveis interações eletrostáticas entre as moléculas positivamente carregadas da quitosana e as superfícies negativamente carregadas de tecidos e células. Luppi *et al.* (2009) afirmam que os hidrogéis constituídos por polímeros mucoadesivos apresentam uma retenção prolongada para administração oral, nasal e vaginal.

Reafirma-se, portanto, a importância dos polissacarídeos na síntese de hidrogéis para aplicações biomédicas e a necessidade de se ter as propriedades mecânicas, estruturais e biológicas adequadas

ao desenvolvimento de materiais que poderão contribuir para novas aplicações em biomedicina e biotecnologia.

3.1.2 Géis de Alginato

O alginato é um polissacarídeo derivado de algas marrons que têm aplicações nas mais diversas áreas: em indústrias de alimentos, têxteis, impressão e produtos farmacêuticos (AUGST *et al.*, 2006). As cadeias macromoleculares são lineares com segmento rígidos e flexíveis. O segmento rígido é atribuído aos blocos G formado pelo monossacarídeo ácido α -L-gulurônico e o segmento flexível está associado aos blocos M que são constituídos de unidades monossacarídicas de ácido β -D-manurônico (LEE e MOONEY, 2012). Tais unidades (M, G) são isômeros conformacionais, uma vez que possuem a mesma fórmula molecular e se diferem apenas no arranjo espacial dos átomos (Figura 3.3). Em sua estrutura química, regiões de blocos MM e GG (homopolímero) são intercaladas por regiões MG (heteropolímero) (RASTOGI *et al.*, 2007; DRAGET *et al.*, 2005).

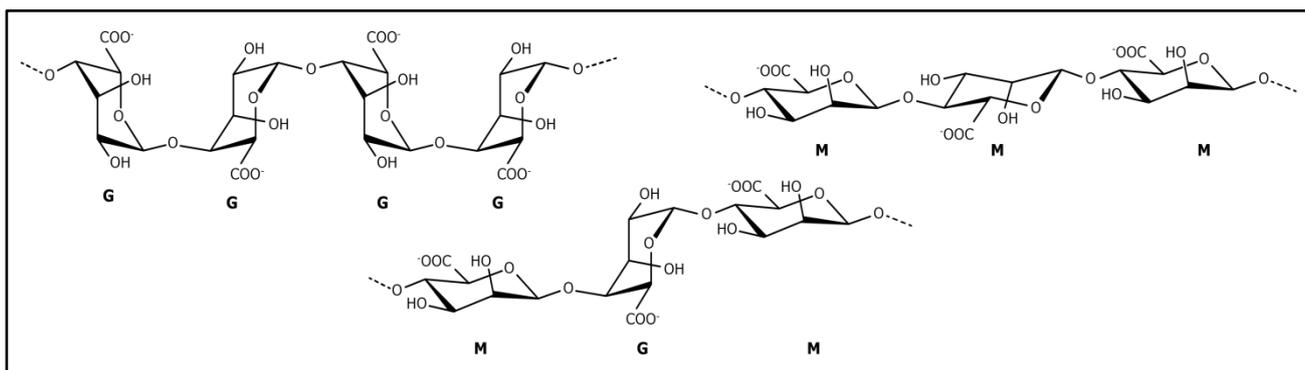


Figura 3.3: Estrutura química das regiões de blocos MM, GG e MG do polímero alginato. (Fonte: DRAGET *et al.*, 2005 - adaptada).

A relação dos blocos (MM, GG, MG) depende da fonte que o alginato é obtido (HAY *et al.*, 2010) e tem influência direta nas suas propriedades físico-químicas. São de grande relevância na área biomédica pela capacidade de formar hidrogéis através de reticulação iônica (utilizando-se cátions

divalentes, tais como cálcio, magnésio ou bário), com características favoráveis para encapsular células e regenerar tecidos (CALIARI e BURDICK, 2016). A interação entre os íons divalentes e os blocos gulurônicos do polímero forma a estrutura denominada “modelo caixa de ovos”, como ilustrado na Figura 3.4.

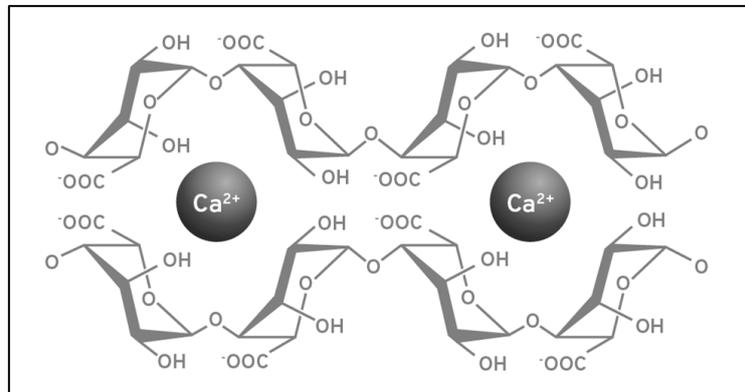


Figura 3.4: Representação esquemática da reticulação iônica dos blocos gulurônicos do polímero alginato com íons cálcio. (Fonte: NASERI *et al.*, 2016 - adaptada).

Géis de alginato são muito utilizados na área biomédica por possuírem também alta porosidade (que permite elevadas taxas de difusão de macromoléculas) e capacidade de se dissolver e biodegradar em condições fisiológicas normais (GOMBOTZ e WEE, 2012). Embora a formação de hidrogéis de alginato seja possível através da reticulação covalente, a maioria das abordagens comerciais utiliza a reticulação iônica. Jungst *et al.* (2016) afirmam que os hidrogéis físicos, obtidos por interações não covalentes entre suas cadeias, são dinâmicos e dotados de propriedades de autocura (YANG *et al.*, 2013), no entanto, muitas vezes apresentam baixa resistência mecânica e estabilidade dimensional; características também relatadas por Elbert (2011). Os hidrogéis químicos, formados por reticulações através de ligações covalentes, apresentam estruturas mecanicamente mais estáveis (JUNGST *et al.*, 2016). Embora a oxidação e a reticulação covalente possam melhorar a sua resistência mecânica, estas modificações químicas comprometem outras propriedades do hidrogel de alginato e reduzem a sua biocompatibilidade (ZHANG *et al.*, 2015).

E assim, a utilização de hidrogéis de alginato para aplicações em engenharia de tecidos é limitada em função da baixa resistência mecânica, liberação rápida de fármaco e baixa capacidade de adesão celular. Visando melhorar tais propriedades, alguns procedimentos para a síntese de hidrogéis de alginato têm sido relatados na literatura: géis de alginato reforçados com nanopartículas, formação de IPNs ou semi-IPNs de alginato e outros polímeros, dentre outros.

Segundo Dash *et al.* (2013), o desenvolvimento de hidrogéis usando nanopartículas, com consequente formação de hidrogéis nanocompósitos, melhora efetivamente as propriedades mecânicas dos mesmos. Assim sendo, estudos utilizando nanoargilas para a síntese de hidrogéis nanocompósitos de alginato foram realizados por Fernandes *et al.* (2017). O objetivo do trabalho foi otimizar a síntese de hidrogéis e obter materiais nanoestruturados com argila, em conformação intercalada; o critério utilizado para definir a melhor formulação foi o grau de inchamento e a homogeneidade das microsferas de hidrogel. Os hidrogéis sintetizados com 2% (m/v) de alginato de sódio apresentaram grau de inchamento satisfatório, além de um aspecto totalmente esférico e de tamanho homogêneo. Com relação ao agente de reticulação, escolheu-se o cloreto de cálcio pela inconstância dos valores de inchamento apresentados pelos hidrogéis de alginato de alumínio, além de serem mais quebradiços e difíceis de manusear. Por meio da análise do grau de inchamento dos nanocompósitos, observou-se que a nanoargila contribuiu para o aumento do grau de inchamento se comparado com hidrogéis controle (alginato de cálcio). Por meio da técnica de difração de raio-X (DRX), foi possível determinar a conformação da nanoargila na matriz do hidrogel, sendo esta incorporada de maneira intercalada nas formulações apresentadas. Portanto, foi possível alcançar a melhor rota de síntese, incluindo os materiais e as concentrações a serem utilizadas. A síntese de hidrogéis à base do polissacarídeo alginato de sódio se mostrou promissora para aplicação destes materiais como carreadores em sistemas de liberação de solutos, voltados para a área médica.

Joddar *et al.* (2016) estudaram os efeitos da adição de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT), funcionalizados com grupos -COOH, como uma fase de reforço dispersa em uma fase contínua de alginato. Os hidrogéis resultantes foram porosos e mostraram uma degradação significativamente menor após 14 dias de estudo, em comparação com o alginato isolado. Estudos celulares *in vitro* mostraram também uma maior aderência e proliferação de células nos hidrogéis

compósitos. A extensão da proliferação celular foi maior quando cultivada em hidrogéis com 1 e 3mg de MWCNT/ mL de alginato (embora todos os hidrogéis compósitos de alginatos terem apresentado uma melhor agregação de células em comparação com o alginato isolado). Dentre todos os hidrogéis compósitos sintetizados (1mg/ mL, 3mg/ mL e 5mg/ mL), os géis com 1mg de MWCNT/ mL de alginato apresentaram a maior rigidez. Os resultados obtidos indicaram que adição de MWCNT funcionalizado ao alginato melhorou características mecânicas, físicas e biológicas do hidrogel de alginato puro. E, portanto, os hidrogéis compósitos de alginato e MWCNT são promissores para aplicações em cultura de células, terapia celular e engenharia de tecidos.

Xu *et al.* (2009) utilizaram alginato para fabricação de hidrogéis funcionais usando o método de bioprototipagem via impressão a jato de tinta. Com o uso de impressoras a jato, híbridos cardíacos contráteis, que exibem um formato 3D retangular, e mesmo parte de um coração (com dois ventrículos conectados), foram fabricados usando camadas alternadas do hidrogel de alginato e células cardíacas de mamíferos.

Markstedt *et al.* (2015) combinaram propriedades mecânicas de nanofibras de celulose (NFC) com a capacidade de reticulação rápida do alginato para a bioimpressão 3D de tecidos, como a cartilagem. A qualidade da impressão foi também avaliada com relação à fidelidade à forma. Os materiais 3D exibiram uma viabilidade celular de 73% e de 86% após 1 e 7 dias da cultura 3D, respectivamente. O estudo demonstrou o potencial do biometarial de alginato e nanoceluloses para bioprinting 3D de tecidos e órgãos. Porém, os hidrogéis com as nanopartículas citadas (nanoargilas ou nanotubos de carbono) apresentaram limitações para aplicações na área médica.

Recentemente, os nanocristais de celulose (CNC) despertaram grande interesse para aplicações em biomedicina, devido a suas excelentes propriedades, tais como alta área superficial e desempenho mecânico, natureza hidrofílica e citocompatibilidade (DASH *et al.*, 2013; NASERI *et al.*, 2016). Além disso, os CNC favorecem o mecanismo de gelificação de hidrogéis, melhoram a estabilidade dimensional, aumentam a resistência mecânica e facilitam a liberação de drogas (ZHANG *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2011).

Lin *et al.* (2012) produziram gel de alginato reticulado com íons cálcio e nanoceluloses oxidadas, por liofilização. Os novos grupos -COOH das superfícies das nanoceluloses oxidadas desempenharam um papel fundamental na estabilidade estrutural e mecânica dos géis sintetizados. Além disso, foi relatada uma maior resistência mecânica induzida por nanocristais de celulose oxidados e a formação de uma rede de polímeros semi-interpenetrantes a partir de nanofibras oxidadas. Observou-se uma elevada porosidade (acima de 80% para todos os ensaios), promissora absorção e retenção de água (1300%) e uma melhor resistência à compressão quando se compara os novos materiais obtidos aos géis de alginato puro. Os resultados sugerem a utilização destes materiais em diversas aplicações práticas, tais como absorvedores de energia cinética, materiais isolantes térmicos e acústicos. Lin *et al.* (2011) sintetizaram um material biomédico para transportar moléculas de fármacos a partir de microsferas de alginato com CNC; como resultado observaram uma melhor eficiência de encapsulamento e promissora aplicação em liberação de fármacos.

Hidrogéis de polímeros naturais, baseados em redes IPNs ou semi-IPNs, também têm se destacado como materiais para aplicação biomédica. Apresentam melhorias nas propriedades mecânicas e biológicas e são citados como uma alternativa promissora para a engenharia de tecidos (MATRICARDI *et al.*, 2013; HAQUE *et al.*, 2012; CHUNG *et al.*, 2011).

Zhang *et al.* (2015) desenvolveram um hidrogel de alginato e sericina (uma proteína natural) utilizando IPNs. A partir de diferentes proporções de alginato/ sericina, ajustaram a resistência mecânica das IPNs, visando atender aos requisitos de rigidez para vários reparos teciduais: as IPNs com alto teor de sericina mostram estabilidade aumentada durante a degradação, evitando o colapso inicial do alginato puro. As IPNs obtidas apresentaram elevadas taxas de inchamento, beneficiando várias aplicações tais como liberação de fármaco. Além disso, os materiais obtidos são adesivos às células, servindo como suportes para a proliferação celular, sobrevivência em longo prazo e migração. As IPNs herdaram a propriedade fotoluminescente da sericina, permitindo a bioimagem *in vivo*. Com este estudo, Zhang *et al.* (2015) sugerem a utilização dos hidrogéis de sericina-alginato para a liberação de células e drogas e como biomateriais para diversas aplicações em engenharia de tecidos.

Hidrogéis de rede poliméricas interpenetrantes (IPN) de alginato de sódio e gelatina, reforçados com nanocristais de celulose (50% em peso), foram preparados via liofilização e estabilizados utilizando

CaCl₂ e genipina, por Naseri *et al.* (2016). As IPNs obtidas foram incorporando CNC modificados (com grupos carboxílicos), a fim de garantir integridade estrutural e estabilidade mecânica do hidrogel. Estudos de morfologia estrutural dos hidrogéis mostraram uma rede tridimensional (3D) de poros interligados, com diâmetros em torno de 10-192µm, e uma rugosidade da parede porosa nanoestruturada com potenciais benefícios para a adesão celular. Foram obtidas melhorias significativas na resistência à tração e à deformação para IPN reticulados CNC. A alta porosidade (> 96%), a alta absorção de fosfato e a citocompatibilidade em relação às células-tronco mesenquimais foram confirmadas e consideradas benéficas para uso dos hidrogéis de alginato como substitutos da cartilagem.

Vários estudos utilizando IPNs de alginato e outros polissacarídeos (como quitosana, goma xantana e carragenana) também foram descritos por Lohani *et al.* (2014) em trabalhos de revisão, como sistemas inovadores para liberação de fármacos.

Pode-se afirmar, portanto, sobre a relevância de se estudar hidrogéis à base de alginato e outro polímeros naturais, como a gelatina (WANG *et al.*, 2016), sericina (ZHANG *et al.*, 2015) e quitosana (RAMLI *et al.*, 2016), com inclusão ou não de nanopartículas para as mais diversas funções, visando desenvolver materiais de maior aplicabilidade em biomedicina.

3.1.2 Géis de Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo, principal derivado da quitina, produzido a partir da sua desacetilação alcalina parcial ou total (Figura 3.5). A quitina é encontrada em exoesqueletos de crustáceos, artrópodes e em alguns fungos. Tem uma estrutura cristalina constituída de uma rede de fibras organizadas. Essa estrutura confere rigidez e resistência aos organismos que a contêm (ROBERTS, 1992).

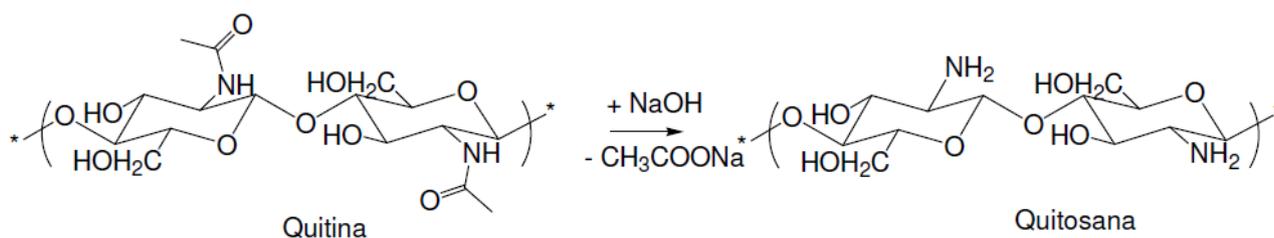


Figura 3.5: Desacetilação alcalina da quitina, geralmente na faixa de temperatura de 80° a 150°C. (Fonte: BRANT, 2008).

Uma das características mais importantes da quitosana é o seu grau de desacetilação (GD), que representa a proporção de resíduos acetilados presentes na sua estrutura (BHATTARAI *et al.*, 2010), e a sua massa molecular. A presença de grupos amino reativos na sua matriz permite modificações químicas, tais como imobilização de agentes quelantes, amidação e formação de complexo polieletrólítico (COSTA Jr. e MANSUR, 2008). A massa molecular influencia também nas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, em suas aplicações. Ressalta-se, porém, a presença de três grupos funcionais reativos na cadeia polimérica da quitosana: o grupo amino na posição C-2, o grupo hidroxila primário na posição C-6 e o grupo hidroxila secundário na posição C-3 (SOUZA *et al.*, 2005) e a modificação química destes grupos permite a obtenção de numerosos materiais com diferentes possibilidades de aplicação. Os grupos amino, presentes em toda a extensão da cadeia polimérica, dão a quitosana um caráter de polieletrólito catiônico ($pK_a \geq 6,5$), fazendo com que o polímero seja solúvel em soluções com o $pH < 6,5$ (KUMAR, 2000) e possa reagir com muitas superfícies/ polímeros negativamente carregados. Portanto, a quitosana é considerada uma base fraca, pouco solúvel em água, mas que se dissolve mediante a adição de ácidos (minerais ou orgânicos) com os quais forma um polication, através da protonação dos grupos amins livres na cadeia polimérica (BRANT, 2008).

A quitosana é conhecida por suas excelentes propriedades, como biodegradabilidade, biocompatibilidade, bioadesão (LOHANI *et al.*, 2014), ação antimicrobiana (RINAUDO, 2008), por

acelerar a cicatrização, uma vez que o contato entre a quitosana e o macrófago ativa a proliferação de fibroblastos, auxiliando a produção de colágeno (SILVA *et al.*, 2006), dentre outras.

Os hidrogéis de quitosana, de grande interesse em biomedicina, podem ser obtidos por reticulações reversíveis, como interações iônicas (com reticuladores como citrato ou tripolifosfato, ou em polieletrólitos complexos - PEC), ou interações secundárias (como em hidrogéis emaranhados de quitosana e poli(álcool vinílico), por exemplo) (BERGER *et al.*, 2004). Podem também ser obtidos por ligações covalentes irreversíveis.

Géis de quitosana obtidos a partir da adição de reticuladores iônicos, negativamente carregados, ou de polímeros aniônicos, formando os chamados polieletrólitos complexos, são denominados géis físicos. Apresentam interações iônicas entre as cargas negativas do reticulante e grupos positivamente carregados de quitosana como sendo as principais interações dentro da rede (Figura 3.6).

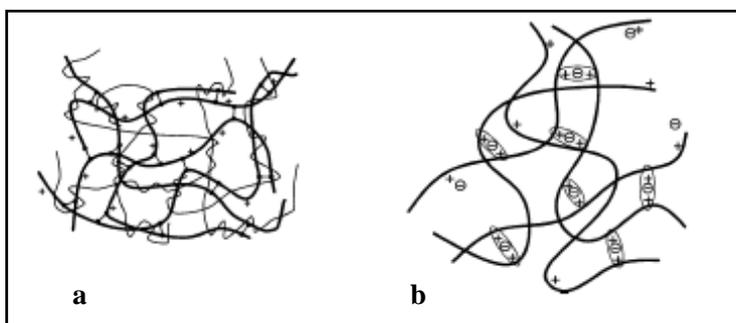


Figura 3.6: Representação esquemática de géis de quitosana ionicamente reticulados (a) PEC. (b) Reticuladores iônicos. (Fonte: BERGER *et al.*, 2004 – adaptada)

Porém, a estabilidade física e as propriedades mecânicas dos géis de quitosana ionicamente reticulados são limitadas em função da densidade de carga dos reticuladores iônicos e da quitosana, diretamente dependes dos valores de pKa e do pH do meio reacional (SHU e ZHU, 2002). As densidades de carga global (da quitosana e do reticulador) devem ser suficientemente altas para permitir as interações iônicas e garantir a formação de um hidrogel. Além disso, o hidrogel formado é suscetível ao pH do meio, restringindo o seu campo de aplicação.

Géis de quitosana covalentemente reticulados formam uma rede tridimensional permanente e permite a livre difusão da água, além de melhorar as propriedades mecânicas do gel. Como resultado destas características interessantes, os hidrogéis de quitosana reticulados covalentemente têm duas aplicações principais: sistemas de liberação de drogas, permitindo a liberação de materiais bioativos por difusão; e como *scaffolds* em cultura celular. Porém, muitos dos reticuladores, atualmente descritos para a quitosana, ainda apresentam limitações para aplicações médicas: o glutaraldeído é conhecido por ser neurotóxico (BETANCOR *et al.*, 2006) e o glioxal por ser mutagênico (MURATA-KAMIYA *et al.*, 1997), dentre outros dialdeídos. A genipina, interessante alternativa aos dialdeídos como reticulador covalente da quitosana, é um material de ocorrência natural (MI *et al.*, 2002) cuja citocompatibilidade e citotoxicidade têm sido avaliadas. Mas, apresenta restrições quanto aos altos valores de mercado.

Outra abordagem de significativa relevância para os géis de quitosana, assim como para os géis de alginato, é a formação de redes poliméricas de quitosana e outros polímeros (IPNs ou semi-IPNs) que interagem por reticulações covalentes, iônicas e/ou interações secundárias, como ligações de hidrogênio através dos grupos hidroxilas. Géis IPNs e semi-IPNs à base de quitosana têm ganhado considerável atenção para sistemas de liberação de drogas (LOHANI *et al.*, 2014), imobilização de enzimas e em engenharia de tecidos (BERGER *et al.*, 2004). Além disso, géis IPNs e semi-IPNs de quitosana também têm sido reportados como sendo mais favoráveis à cultura celular do que os géis da própria quitosana reticulada (BERGER *et al.*, 2004).

Rani *et al.* (2011) relataram o uso de esferas de géis IPNs quitosana/ glicina/ ácido glutâmico, reticulados com glutaraldeído, para liberação controlada de drogas. Os resultados obtidos foram promissores e foi observado que o grau de inchamento e a liberação de drogas dependem do pH, grau de reticulação e da composição da rede polimérica.

Reddy *et al.* (2013) sintetizaram micropartículas de géis IPNs quitosana/ goma ghatti, por reticulação em emulsão, usando glutaraldeído como um agente de reticulação. As micropartículas foram usadas para liberação controlada de diclofenaco de sódio no intestino. Análises de FTIR avaliaram a formação da estrutura IPN. Verificou-se que a liberação de fármaco das micropartículas de IPN foi prorrogada até 12 horas.

Silva (2015) estudou o sistema semi-IPN alginato e quitosana, reticulados com CaCl_2 ou glutaraldeído para aplicação em diversas áreas da biomedicina. A combinação desses polímeros implicou em hidrogéis estáveis, capazes de alterar a sua viscosidade e o grau de inchamento dependendo do pH, da pressão e da temperatura, mas baixa resistência mecânica foi alcançada. A característica mais importante do sistema produzido foi a tixotropia. O hidrogel é citado como um material potencial para aplicações em regiões como o intestino, a pele ou o olho humano, sendo útil para sistemas de liberação controlada de fármacos e sistemas injetáveis.

Li *et al.* (2005) estudaram a citocompatibilidade e viabilidade celular de *scaffolds* semi-IPNs de quitosana e alginato, reticulados com CaCl_2 . Estudou-se, *in vitro*, a morfologia celular, proliferação e funcionalidade das células no material sintetizado. Obteve-se maior e mais rápida proliferação celular no gel semi-IPN quitosana/ alginato quando comparado ao gel de quitosana pura. As células no gel semi-IPN quitosana/ alginato mantiveram sua morfologia esférica ao longo do período de estudo e as análises das proteínas extraídas de células cultivadas nos *scaffolds* do gel semi-IPN produzidos indicou que a produção do tipo de colágeno específico da cartilagem aumentou da segunda semana para a terceira semana; mas, diminuiu no suporte de quitosana. Este estudo sugere que novos géis semi-IPNs quitosana/ alginato promovem a proliferação celular, aumentam a expressão do fenótipo de condrócitos HTB-94 e podem, potencialmente, servir como alternativa melhorada aos *scaffolds* de quitosana em engenharia de tecidos. Porém, não foram realizados ensaios mecânicos para os novos materiais produzidos.

Ramli *et al.* (2016) realizaram a síntese de um *scaffold* de hidrogel semi-IPN alginato e quitosana, reticulado com CaCl_2 e com inclusão de nanopartículas de prata como agente bactericida. Caracterizaram os grupos funcionais do biomaterial composto para confirmação de tais inclusões e a partir da análise de espectros de FTIR, observaram a deslocamento do estiramento $\text{C}=\text{O}$ do grupo amino da quitosana, indicando a ligação das nanopartículas de Ag aos grupos N-H.

Li *et al.* (2005) produziram *scaffold* biodegradável a partir de géis semi-IPNs de alginato e quitosana, reticulados com Ca^{2+} , com potencial aplicação em engenharia de tecidos. O material obtido apresentou propriedades mecânicas e biológicas significativamente melhoradas, se comparado à quitosana pura. As melhorias nas propriedades mecânicas foram atribuídas à formação de uma

estrutura complexa de quitosana e alginato. Osteoblastos, células formadoras de osso, fixaram à estrutura de quitosana-alginato e proliferaram. O estudo *in vivo* mostrou um alto grau de compatibilidade tecidual. Os autores sugerem que os novos géis semi-IPNs de alginato e quitosana tenham potencial para acomodar e estimular o crescimento de novos tecidos.

Assim, pode-se confirmar a relevância dos hidrogéis multicomponentes de alginato e quitosana, baseados em redes de polímeros semi-IPN para aplicações biomédicas. A fim de melhorar o desempenho mecânico e as propriedades biológicas dos géis de alginato e géis semi-IPNs de alginato e quitosana, o presente trabalho se dedica ao estudo das nanoceluloses, com e sem modificação química, adicionadas a estas redes poliméricas. Espera-se que os novos materiais sintetizados apresentem propriedades físico-químicas e biológicas favoráveis para potencial aplicação na área médica.

3.2 Nanoceluloses

As fibras vegetais são exemplos de sistemas complexos desenvolvidos pela natureza (MOREIRA, 2010). São basicamente constituídas por celulose, hemicelulose e lignina. Pectina, pigmentos e extrativos podem ser encontradas em menores quantidades. Por esta razão, as fibras naturais são também chamadas de fibras celulósicas ou lignocelulósicas.

A celulose é um polímero formado por cadeia linear, não ramificada, de moléculas de glicose unidas por ligações do tipo β (1 \rightarrow 4) glicosídicas. A celulose forma a base estrutural da parede celular de plantas e é também produzida por outros organismos como algas, fungos e algumas bactérias (BROWN *et al.*, 1976; ROSS *et al.*, 1991).

A composição química e a estrutura da célula de fibras naturais são complexas: cada fibra é, essencialmente, um composto onde as microfibrilas de celulose rígidas são incorporadas a uma matriz amorfa composta principalmente de lignina e hemicelulose (SATYANARAYANA *et al.*, 1990; RONG *et al.*, 2001). As fibrilas de celulose são alinhadas ao longo do comprimento da fibra, o que resulta em máxima resistência à tração e flexão, além de fornecer rigidez no eixo das fibras. A

eficiência do reforço da fibra natural está relacionada com a natureza da celulose e sua cristalinidade (LEÃO *et al.*, 2009); são materiais biodegradáveis, de grande importância na síntese de novos materiais (JOHN *et al.*, 2008). A Figura 3.7 apresenta, esquematicamente, a organização das microfibrilas de celulose, com regiões cristalinas e não cristalinas.

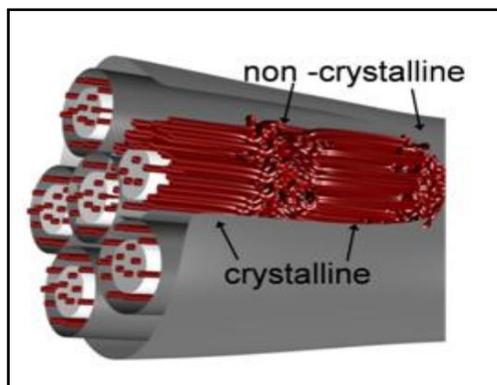


Figura 3.7: Representação esquemática da organização das microfibrilas de celulose. (Fonte: PÄÄKÖ *et al.*, 2007 - adaptada)

Compostos poliméricos a partir de celulose têm sido amplamente estudados visando aplicações médico/ farmacêuticas (CAVALCANTI *et al.*, 2001). É de interesse científico e tecnológico a busca por propriedades que direcionem a formação de novos materiais de degradação lenta e/ou controlada (RECOUVREUX, 2008) e que sejam capazes de proteger os sistemas terapêuticos contra fatores de riscos ambientais e interações entre constituintes da mesma formulação. As nanoceluloses ganharam atenção especial nas pesquisas científicas nos últimos anos. Eichhorn *et al.* (2010) destacam a sua utilização em aplicações funcionais devido à citocompatibilidade e sustentabilidade. Markstedt *et al.* (2015) relatam um crescente interesse em se utilizar nanoceluloses como biomaterial em função da hidrofiliabilidade e da ampla capacidade de modificação química combinadas.

Dependendo da fonte de celulose e das condições de processamento, as nanoceluloses são divididas em três categorias principais: celulose bacteriana (CB), nanocristais de celulose (CNC) e nanofibras de celulose (NFC) (KLEMM *et al.*, 2011). A celulose bacteriana é um biopolímero que possui algumas características específicas que torna viável a sua aplicação na manufatura de artefatos para aplicações biomédicas, como suporte estrutural em engenharia de tecidos, carreador de fármacos de

liberação controlada, membrana para hemodiálise quando modificada (ANTÔNIO *et al.*, 2012). As bactérias produtoras são capazes de converter fontes de carbono, como por exemplo, a glicose, em celulose, sendo esta uma atividade fundamental de seu metabolismo. A glicose, neste caso, atua como fonte fornecedora de energia e como matéria-prima na síntese de um biopolímero. Os dois outros tipos de nanoceluloses (CNC e NFC) podem ser obtidos a partir de várias fontes, tais como fibras naturais e animais marinhos (AZIZI SAMIR *et al.*, 2005). O presente trabalho dedica-se ao estudo de novos materiais que utilizam as nanoceluloses obtidas a partir de fontes vegetais (CNC e NFC).

As microfibrilas de celulose individuais têm diâmetros entre 2 e 20nm. Cada microfibrila pode ser considerada como uma cadeia de cristais de celulose ligados ao longo do eixo por nanofibras desordenadas de domínios amorfos como torções e dobras (SIQUEIRA *et al.*, 2010). Os cristais de celulose de tamanho nanométrico são comumente chamados de *whiskers* ou nanocristais de celulose. Novas técnicas para extração de nanocristais de celulose e a aplicação destes em materiais poliméricos têm sido pesquisadas (AZIZI SAMIR *et al.*, 2004). A extração de regiões cristalinas de celulose, sob a forma de *nanowhiskers*, é um processo simples com base na hidrólise ácida. Ranby e Ribbi, em 1949-1950, foram os pioneiros na produção de suspensões estáveis de cristais de celulose de tamanho coloidal por hidrólise da madeira e da celulose de algodão, utilizando ácido sulfúrico, (RANBY, 1949; RANBY e RIBBI, 1950).

Nanofibras de celulose, extraídas por uma desintegração mecânica da polpa de celulose, foram obtidas pela primeira vez por Herrick *et al.* (1983) e Tubark *et al.* (1983). Contrariamente aos nanocristais rígidos, as nanofibras de celulose são nanopartículas longas e flexíveis. NFC é composta de microfibrilas de celulose, mais ou menos individualizadas, apresentando diâmetros na ordem de 10 a 100nm, e comprimento geralmente na escala micrométrica (ANDRESEN *et al.*, 2006). Apresentam domínios amorfos e cristalinos, ordenados de forma alternada, em uma estrutura tipo teia (LU *et al.*, 2008). A Figura 3.8 ilustra, esquematicamente, as nanopartículas de celulose extraídas a partir da fibra, bem como imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos CNC e microscopia de força atômica (AFM) das NFC.

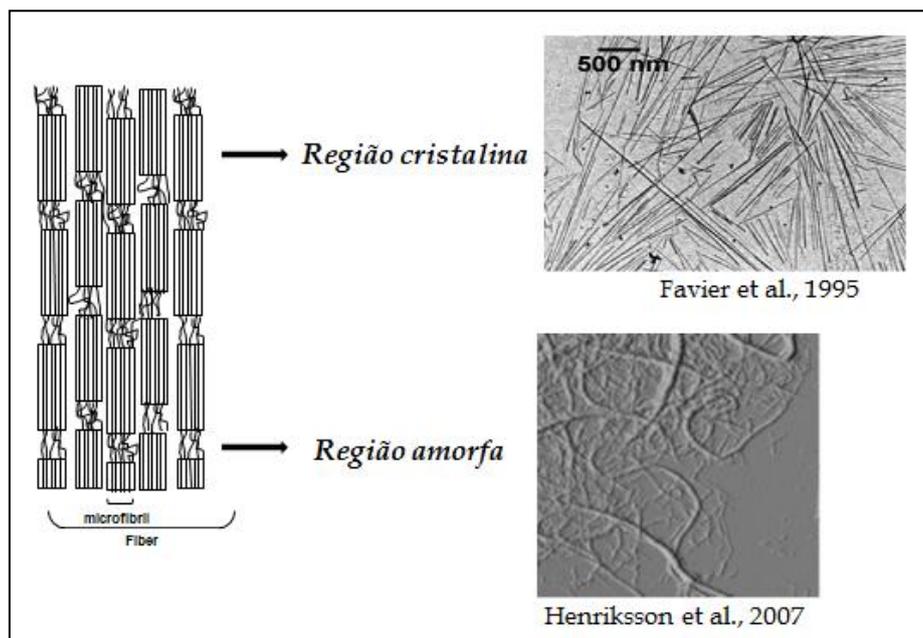


Figura 3.8: Representação esquemática das nanoceluloses e imagens da sua morfologia - MEV dos CNC. (Fonte: FAVIER *et al.*, 1995); AFM das NFC (Fonte: HENRIKSSON *et al.*, 2007).

Os primeiros resultados da investigação sobre nanoestruturas dispersas em uma matriz polimérica são, relativamente, recentes (DALMAS *et al.*, 2007). Esta nova geração de materiais híbridos, nanoestruturados, constitui uma classe de materiais que podem também ser denominados nanocompósitos e são produzidos pela incorporação de materiais que tenham pelo menos uma dimensão menor do que 100nm (KAMEL *et al.*, 2007). Tal como acontece nos materiais tradicionais, quando se tem nanocompósitos, um dos componentes serve de matriz na qual as partículas do segundo material se encontram dispersas (ESTEVEZ *et al.*, 2004). Desenvolvimentos recentes em pesquisa sobre nanopartículas em filmes nanocompósitos criaram uma ampla literatura dedicada às nanoceluloses que as tornam um tema da atualidade. Dentre as vantagens de se utilizar nanoceluloses em sistemas poliméricos pode-se destacar a redução da densidade, melhoria das propriedades mecânicas, melhor transferência de *stress*, melhor estabilidade dimensional e outras propriedades específicas, através da incorporação de aditivos e/ou agentes de processos (SOUZA, 2010).

Silva *et al.* (2009) também ressaltam a importância das nanoceluloses para a síntese de novos materiais: as nanofibras de celulose são materiais promissores devido a sua alta resistência mecânica,

que chega a ser comparada às poli(aramidas), além do seu caráter renovável e biodegradável. Porém, destacam a necessidade de se intensificar as pesquisas sobre a utilização de fibras lignocelulósicas no desenvolvimento de polímeros e compósitos que aproveitem em sua totalidade as características únicas das várias matrizes lignocelulósicas existentes.

Sistemas poliméricos onde são adicionadas nanoceluloses, como em nanocompósitos, geralmente apresentam propriedades superiores de estabilidade térmica, resistência mecânica e de permeação de líquidos e gases, mesmo quando estão em baixa concentração (DUFRESNE, 2006). Dentre outros pontos relevantes que estimulam a utilização de nanoceluloses em novos materiais destacam seu caráter biodegradável, baixo custo e o fato de serem obtidas a partir de fontes naturais renováveis altamente abundantes (TEIXEIRA *et al.*, 2010).

Azizi Samir *et al.* (2005) apresentam numerosas outras vantagens em se utilizar nanoceluloses em sistemas poliméricos para a síntese de novos materiais, como baixa densidade, grande variedade de fontes disponíveis, baixo consumo de energia para obtenção, elevadas propriedades específicas, abrasividade modesta durante o processamento e superfície relativamente reativa, que pode ser usada para reações em grupos específicos. Destacam também algumas desvantagens como elevada absorção de umidade, incompatibilidade com a maioria das matrizes poliméricas e limitação da temperatura de processamento; na verdade, materiais lignocelulósicos começam a degradar perto de 220°C, restringindo o tipo de matriz que pode ser utilizada em associação às fibras naturais (AZIZI SAMIR *et al.*, 2005; WAMBUA *et al.*, 2003).

Zhou *et al.* (2013) desenvolveram hidrogéis superabsorventes à base de nanofibras de celulose, carboximetilcelulose, poli(ácido acrílico-co-acrilamida) e concluíram que fatores como quantidade de NFC, tipo de sal, temperatura e pH, influenciam diretamente nas propriedades físico-química dos hidrogéis desenvolvidos. Os resultados mostram que, após adição de 2,5% de NFC, a capacidade de absorção de água aumentou de 245,8 para 458,7g/ g. Em outros estudos, Gonzalez *et al.* (2014) produziram hidrogéis de poli(álcool vinílico) e nanofibras de celulose e investigaram a utilização destes como curativo em feridas. Os autores observaram que a incorporação de nanofibras melhorou as propriedades mecânicas e de barreiras contra bactérias, o que dificultou a penetração de bactérias na pele durante 15 dias. Yadollahi *et al.* (2015) desenvolveram hidrogéis à base de

carboximetilcelulose/ZnO e estudaram sua potencialidade na área médica. Os hidrogéis de carboximetilcelulose com ZnO exibiram inchamento maior que os hidrogéis puros e sua atividade antimicrobiana foi considerada eficiente contra *E. coli* (gram-negativa) e *S. aureus* (gram-positiva).

As técnicas de processamento de materiais nanoestruturados são fatores importantes e influenciam diretamente nas propriedades finais dos mesmos (SILVA *et al.*, 2009). A obtenção de materiais homogêneos é o principal desafio no processo de preparação. A utilização de polímeros hidrossolúveis facilita a dispersão das nanoceluloses no meio reacional; solventes orgânicos também podem ser utilizados para dispersar as NFC, mas é necessário o emprego de surfactantes (BONINI *et al.*, 2002); ou até mesmo nanofibras de celulose com superfícies hidrofobicamente modificadas (ARAKI *et al.*, 2001; GRUNERT *et al.*, 2002) podem ser utilizadas para facilitar a obtenção de materiais mais homogêneos. Nos últimos anos, materiais poliméricos estruturados com nanoceluloses têm se destacado como uma nova classe de materiais e atraído crescente interesse nas pesquisas científicas (LUNZ *et al.*, 2012). Há muito a ser descoberto sobre as propriedades das nanoceluloses, desde a sua produção até a incorporação em novos materiais, bem como as inúmeras aplicações e propriedades finais dos materiais obtidos.

3.2.1 Modificações químicas em nanocelulose

A celulose é considerada um material interessante para síntese de novos materiais, porém a presença dos grupos hidroxila sobre a superfície das fibrilas resulta em aglomerações e limita a sua utilização.

A fim de se reduzir as interações entre os grupos -OH das superfícies das nanoceluloses, modificações químicas nestas superfícies são pré-requisitos, muitas vezes inevitáveis, para adaptar as propriedades interfaciais de substratos de nanoceluloses ou ajustar seu equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico (HABIBI, 2014). O método de modificação química da superfície das NFCs e CNCs contribuem para transformá-los em materiais co-contínuos, através de ligações covalentes entre o agente de compatibilização e as nanoceluloses, sendo, portanto, de grande interesse no processamento de novos materiais nanoestruturados.

Isocianato de cadeia longa (SIQUEIRA *et al.*, 2010), ácidos de cadeias longas (MENEZES *et al.*, 2009) e PCL via polimerização por abertura de anel, do inglês “*ring open polymerization*” (GOFFIN *et al.*, 2011), têm sido relatados como opções para modificações química de nanocristais e nanofibras de celulose. As nanoceluloses modificadas foram usadas como reforço em diferentes matrizes poliméricas tais como PCL, PE e NR.

Habibi (2014) também apresenta em seu trabalho de revisão algumas outras possibilidades para modificar a superfície das nanoceluloses conferindo-lhes propriedades específicas e aplicações sofisticadas. Modificações não-covalentes da superfície de nanoceluloses são tipicamente feitas através de adsorção de surfactantes que alteram as propriedades superficiais e interfaciais de um material. Assim, as interações da matriz polimérica com o substrato nanocelulose (nanofibras ou nanocristais) são asseguradas pela hidrofiliabilidade, atrações eletrostáticas, ligações de hidrogênio ou forças de van der Waals. Esta abordagem foi relatada pela primeira vez por Heux *et al.* (2000) que utilizaram surfactantes (à base de mono e diésteres de ácido fosfórico com alquilfenol) para modificar CNC. As moléculas do tensoativo formaram uma fina camada de, aproximadamente, 15Å na superfície dos CNCs que dispersaram muito bem em solventes não polares (BONINI *et al.*, 2002). Além disso, quando os CNCs revestidos foram incorporados à matriz de polipropileno mostraram boa compatibilidade e atuaram como notáveis agentes de nucleação (LJUNGBERG *et al.*, 2006).

Outra modificação citada por Habibi (2014) é a sulfonação de CNC durante a hidrólise catalisada por ácido sulfúrico, através da esterificação de grupos hidroxila. Embora a presença destes ésteres sulfato na superfície dos CNCs comprometa a sua estabilidade térmica (ROMAN e WINTER, 2004), eles são altamente desejados para a formação de suspensões coloidais estáveis, que, após secagem controlada, formam filmes opticamente ativos. No entanto, os níveis de esterificação dependem diretamente de vários fatores, como o tempo de hidrólise, temperatura, concentração de ácido etc, tornando-se muito difícil qualquer controle preciso da quantidade de grupos sulfato.

Saito *et al.* (2007) descrevem sobre a oxidação de grupos hidroxila das nanoceluloses utilizando (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila)-mediada (ou oxidação mediada por TEMPO). A oxidação da celulose foi utilizada para converter os grupos hidroximetila à sua forma carboxílica. Esta reação de

oxidação é altamente seletiva para grupos hidroxilas primárias e foi escolhida para modificar nanofibras e nanocristais de celuloses utilizados no presente estudo.

Normalmente, a oxidação mediada por TEMPO envolve a aplicação de um radical nitroxila estável, na presença de hipoclorito de sódio e brometo de sódio. A utilização desta técnica tem sido objeto de estudos desde a sua introdução por de Nooy *et al.* (1994), primeiros a mostrar que apenas os grupos hidroximetila de polissacáridos são oxidados, ao passo que as hidroxilas secundárias permanecem inalteradas. No caso das NFC, a oxidação mediada por TEMPO é muito utilizada para facilitar a individualização das fibras antes do processamento mecânico. Após alterar o seu potencial estrutural, diminuindo a sua rigidez a partir de quebras de ligações de hidrogênio dentro das nanopartículas, estas fibras de celulose TEMPO-oxidadas podem ser facilmente convertidas em nanofibras individuais, altamente cristalinas, utilizando-se agitação mecânica. Este método tem sido utilizado para uma variedade de fibras celulósicas (SAITO *et al.*, 2007; BESBES *et al.*, 2011). As condições ideais de reação, relatadas por Habibi (2014), são pH 10 e temperatura ambiente, produzindo-se nanofibras de celulose de 3-20nm de diâmetro e alguns micrômetros de comprimento, dependendo da matéria-prima celulósica utilizada.

A oxidação mediada por TEMPO, de CNCs obtidos a partir de hidrólise com HCl, foi relatada pela primeira vez por Araki *et al.* (2001). Os autores demonstraram que, após a oxidação, os CNCs mantiveram a sua integridade morfológica inicial e formaram uma suspensão homogênea quando dispersos em água. A base para esta última observação foi a presença de grupos carboxilatos que transmitiam cargas negativas às superfícies dos CNCs e, portanto, induzia a estabilização eletrostática; tal observação foi confirmada nos trabalhos desenvolvidos por Habibi *et al.* (2006).

Habibi (2014) também cita reações de esterificação, eterificação, uretanização, amidação, dentre outras, como alternativas para se modificar NFC e CNC e garantir uma maior solubilidade e dispersão das nanoceluloses em solventes apolares. Para este estudo, são reações de menor relevância. O objetivo de se modificar quimicamente as nanoceluloses, via oxidação mediada por TEMPO, para o presente trabalho, é intensificar o número de grupos carboxilatos disponíveis nos sistemas estudados: gel de alginato e nanoceluloses e géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses. E assim, avaliar

os efeitos das nanoceluloses adicionadas aos sistemas nas propriedades finais dos géis, visando uma melhor estabilidade mecânica e bioadesão dos compostos formados.

CAPÍTULO 4

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente capítulo descreve os materiais e métodos utilizados para a extração e modificação química das nanofibras e nanocristais de celulose, a partir da oxidação de grupos hidroxilas, e a caracterização das nanoceluloses antes e após a funcionalização. Descreve a síntese e caracterização física, química e biológica de géis de alginato e nanoceluloses e géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses visando aplicação biomédica.

4.1 Materiais

Todas as fibras de celulose utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir da polpa Kraft branqueada de *Eucalyptus* (adquirida da Suzano Papel e Celulose e da Bahia Pulp).

Para oxidação das fibras de celulose utilizou-se solução de hipoclorito de sódio (NaClO), 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila (TEMPO-C₉H₁₈ON, 98%), brometo de sódio (NaBr), ácido clorídrico (HCl, 37%), ácido sulfúrico (H₂SO₄, 98%) da SIGMA-ALDRICH. Hidróxido de sódio (NaOH) de qualidade laboratorial FMAIA, foi utilizado sem tratamento adicional.

A síntese dos géis foi feita com alginato de sódio de alta massa molecular ($M_w = 1 \times 10^6$ g/ mol), um copolímero formado por unidades de ácido Gulurônico (G) e Manurônico (M), com razão M/G= 1,56, viscosidade de, aproximadamente, 250cP (a 25°C, em 2% em H₂O), adquirido da SIGMA-ALDRICH. A quitosana utilizada é de origem chinesa de baixa massa molar (<100kDa) fornecida pela empresa PHYTOMARE e possui um grau de desacetilação médio maior que 90% (determinado por nosso grupo de pesquisa, através de titulação potenciométrica, FTIR e RMN 1H). Ácido Acético Glacial (C₂H₄O₂, 99,8%) e o cloreto de cálcio (CaCl₂.2H₂O) da VETEC® QUÍMICA FINA Ltda, com grau analítico.

Para a solução salina fosfatada utilizou-se cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) e fosfato de potássio anidro (K_3PO_4) da SYNTH, fosfato de sódio monohidratado ($Na_3PO_4 \cdot 1H_2O$) VETEC® QUÍMICA FINA Ltda e ácido ortofosfórico (H_3PO_4 , 85%) NEON. Todos os reagentes obtidos foram utilizados conforme recebidos, sem qualquer tipo de purificação prévia.

Para a cultura de células utilizou-se Fibroblastos de rato L929, adquiridos da American Type Culture Collection (ATCC: Manassas, Va, EUA) e meio Dulbecco Medium Eagle's High Glucose (DMEM), com alto teor de glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e solução antibiótica (0,1mg/ mL de estreptomicina e 100U/ mL de penicilina). O brometo de (4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi adquirido da Gibco-Invitrogen, Brasil. As células foram cultivadas a 37°C numa atmosfera umidificada com 95% de ar e 5% de CO_2 . As células foram sub-cultivadas atingindo 80% de concentração, semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 6×10^3 células/ poço e cultivadas por 24h.

4.2 Métodos

4.2.1 Extração, funcionalização e caracterização das nanoceluloses

Nanofibras (NFC) e nanocristais de celulose (CNC), isolados a partir de polpa de celulose branqueada foram extraídos a partir de tratamentos químicos e mecânicos:

- *NFC*: as nanofibras, isoladas a partir de polpa de celulose por tratamentos mecânicos, foram fornecidas pela empresa Suzano Papel e Celulose. As fibras de celulose foram suspensas em água (2% m/m) e moídas utilizando um moinho Supermass Colloider (MKZA10-20J CE Masuko Sangyo, Japão) até obtenção final da suspensão de NFC (1,5% m/m).
- *CNC*: os nanocristais foram preparados a partir da polpa Kraft branqueada no Laboratório de Físico-Química da UFMG. Realizou-se a hidrólise com ácido sulfúrico (H_2SO_4 65% v/v, 50°C em banho-maria, sob agitação mecânica constante durante 50 minutos (ou até adquirir uma coloração levemente amarronzada). Foram realizadas 3 diluições com água milli-Q, seguidas de centrifugações, para remoção do sobrenadante até a obtenção de uma suspensão leitosa,

sem presença de precipitados. A suspensão foi transferida para membranas de diálise. Sucessivas trocas de água foram realizadas até que o pH da suspensão fosse igual ao da água destilada utilizada no processo de hidrólise (pH 6). As soluções dialisadas foram sonicadas por 2 min em ultrassom de ponta (Unique Sonicator, 40 kHz) e filtradas em papel de filtro qualitativo para evitar aglomerados na suspensão final. As suspensões de CNC resultantes apresentaram concentrações de, aproximadamente, 1,5% (m/m).

A fim de avaliar a influência da morfologia dos CNCs e NFCs nos géis de alginato e nos géis semi-IPNs alginato/ quitosana, bem como o efeito das cargas superficiais nas características dos géis, realizou-se a funcionalização de grupos hidroxilas das nanoceluloses, via oxidação mediada por TEMPO.

A conversão dos grupos OH da superfície das nanoceluloses a grupos -COO^- foi realizada de acordo com o método descrito por Saito *et al.* (2007), utilizando o TEMPO como catalisador e hipoclorito de sódio como agente oxidante:

- *Nanofibras TEMPO-oxidadas (NFCT)*: Para cada 1g de polpa de celulose (a concentração de 2% m/m) utilizou-se 0,016g de TEMPO, 0,1g de NaBr e 5,35mL de NaClO à 14% (m/m). A reação ocorreu em pH 10. Após oxidação, as fibras foram lavadas com água destilada até que o pH das fibras se igualasse ao pH da água de lavagem. Preparou-se suspensões 2% (m/m) de fibras em água.
- *Nanocristais TEMPO-oxidados (CNCT)*: o procedimento de oxidação TEMPO foi adaptado do método descrito por Saito *et al.* (2007). O catalisador TEMPO e o NaBr foram dissolvidos em água até concentrações de 0,1mmol e 1,0mmol por grama de CNC, respectivamente. Em seguida foram misturados com a suspensão de CNC (2% m/m). O pH da suspensão foi ajustado para 10 com solução de NaOH (0,25mol/L). A reação foi iniciada pela adição de hipoclorito de sódio gota a gota. A quantidade de NaClO foi escolhida de modo a obter um grau de oxidação de 1,0mmol por grama de polpa de celulose (0,744g). O CNCT foi lavado até a sua condutividade ser semelhante à da água destilada usando membrana de diálise (6-8 kDa).

Espera-se a oxidação dos grupos -OH primários (C6) da celulose a grupos -COO⁻ (C6) pela combinação TEMPO/ NaBr/ NaClO, em meio aquoso, pH 10-11 (ISOGAI *et al.*, 2011), conforme esquematizado na Figura 4.1.

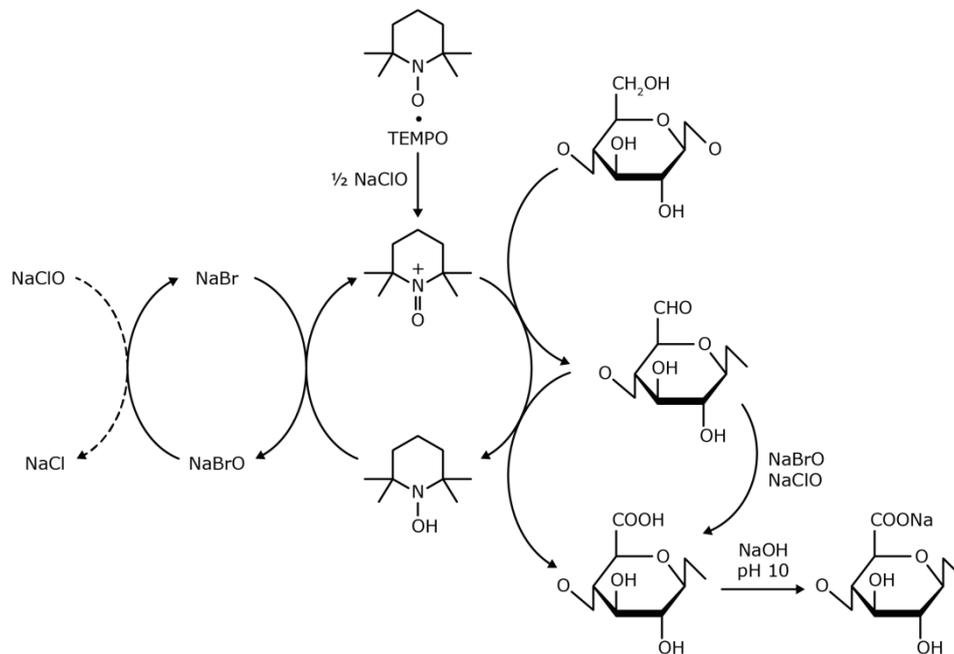


Figura 4.1: Representação esquemática da reação de oxidação mediada por TEMPO de nanoceluloses. (Fonte: ISOGAI *et al.*, 2011- adaptada).

Para determinar o grau de oxidação (GO) dos grupos hidroxilas das nanoceluloses modificadas a grupo -COO⁻, realizou-se uma titulação condutimétrica, conforme descrito por Saito e Isogai (2004): aproximadamente, 50mg de nanocelulose TEMPO foi suspensa em solução de ácido clorídrico 0,05mol/L e o pH ajustado para 2,7 a fim de protonar todos os grupos ácidos presentes na superfície da fibra .

Ao obter uma suspensão estável, titulou-se com NaOH 0,01mol/L e grau de oxidação (GO), ou quantidade total de grupos carboxilatos das nanoceluloses TEMPO-oxidadas, foi calculado a partir da equação (4.1):

$$GO = C(V2 - V1) / m \quad (4.1)$$

Onde, C: é a concentração de NaOH (mol/L); V1: volume de NaOH necessário para neutralizar os ácidos fortes (mL); V2: volume de NaOH necessário para titular o H⁺ dos grupos ácido carboxílico (mL); m: a massa da amostra seca (g).

4.2.2 Géis de alginato e nanoceluloses

O polímero alginato de sódio apresenta uma característica importante para a formação praticamente instantânea de hidrogéis. Quando inseridos em meio contendo íons bi ou trivalentes (Ca²⁺, Ba²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Al³⁺), há uma espontaneidade na formação de hidrogéis devido à forte interação entre alginato-íons reticuladores (FERNANDES *et al.*, 2017).

Dentre as várias possibilidades de aplicação das nanoceluloses cita-se os géis de alginato, devido ao seu caráter hidrofílico, assim como as características iniciais das fibras.

Neste estudo propriedades físicas, químicas e biológicas de géis de alginato e nanoceluloses (com e sem modificação química) foram investigadas. Avaliou-se a influência do tipo de nanocelulose (CNC/ NFC) e da concentração das mesmas nas propriedades finais dos géis funcionais.

- ***Síntese dos géis de alginato e nanoceluloses TEMPO oxidadas e sem modificação química***

Para fins comparativos, preparou-se, primeiramente, um gel de alginato reticulado com íons cálcio (Alg_Ca²⁺). Uma solução do polissacarídeo alginato de sódio 2% (m/ v) foi preparada, transferida para uma placa de Petri, congelada com nitrogênio líquido (-196°C) por 5min e liofilizada a -50°C, por 48h (liofilizador de bandejas Terroni LC 3000). O material seco foi então adicionado a um banho de CaCl₂ a 2% (m/ v), por 24h, à temperatura ambiente, para que a reticulação acontecesse e se formasse o gel. Por fim, o gel foi lavado com água destilada para a remoção de íons cálcio em excesso,

congelados com nitrogênio líquido e liofilizados novamente por mais 48h. O procedimento adotado é semelhante ao descrito por Lin *et al.* (2012).

Para a síntese dos géis de alginato e nanoceluloses, fez-se, primeiramente, a dispersão das nanoceluloses em solução de alginato de sódio (2% m/v), utilizando um ultrassom de ponta por 1 minuto. As concentrações de nanoceluloses utilizadas no presente estudo estão apresentadas na Tabela IV. 1. Em seguida, as amostras foram também liofilizadas por 48h e reticuladas com íons Ca^{2+} utilizando-se solução de CaCl_2 2% (m/ v), por 24h. Por fim, os materiais reticulados foram lavados com água destilada para a remoção de íons cálcio em excesso e liofilizados por mais 48h.

Tabela IV.1: Reagentes para as sínteses dos géis de alginato e nanoceluloses

Amostra	Alginato (g)	Nanocelulose (g)	Razão nanocelulose/alginato	H₂O_{total} (mL)
Alg_Ca²⁺	0,200	0,000	0,000	10,0
Alg_CNC10	0,281	0,030	0,100	16,8
Alg_CNC36	0,200	0,112	0,560	20,0
Alg_CNC50	0,156	0,156	1,000	21,7
Alg_CNCT10	0,281	0,030	0,100	16,8
Alg_CNCT36	0,200	0,112	0,560	20,0
Alg_CNCT50	0,156	0,156	1,000	21,7
Alg_NFC10	0,281	0,030	0,100	16,8
Alg_NFC36	0,200	0,112	0,560	20,0
Alg_NFC50	0,156	0,156	1,000	21,7
Alg_NFCT10	0,281	0,030	0,100	16,8
Alg_NFCT36	0,200	0,112	0,560	20,0
Alg_NFCT50	0,156	0,156	1,000	21,7

Priorizou-se a relação entre a massa das nanoceluloses adicionadas aos sistemas e a massa total de sólidos presentes, sendo:

- Alg_nanoceluloses 10: 10% (m/m) de nanocelulose; 90% (m/m) de alginato
- Alg_nanoceluloses 36: 36% (m/m) de nanocelulose; 64% (m/m) de alginato
- Alg_nanoceluloses 50: 50% (m/m) de nanocelulose; 50% (m/m) de alginato

4.2.3 Géis de alginato/ quitosana e nanoceluloses

Para a reação de formação dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses faz-se necessária a interação iônica dos grupamentos carboxílicos do alginato com os grupamentos amino da quitosana, além da reticulação dos grupos -COO^- , livres no sistema, com os íons Ca^{2+} adicionados ao mesmo. A reação foi realizada em meio aquoso, sendo necessário que ambos polieletrólitos estivessem na forma ionizada; isso acontece em intervalo de pH próximo aos intervalos de pKa dos dois polímeros (SENEL *et al.*, 2000). O alginato, composto de sequências de ácido manurônico (M) e gulurônico (G), apresenta os valores de pKa de 3,38 e 3,65 para as sequências M e G, respectivamente. A quitosana apresenta um valor médio de pKa 6,3. Logo, para o sistema escolhido, o intervalo da reação de complexação deve ocorrer entre 3,5 - 6,3. No presente estudo utilizou-se pH 5,3, após testes iniciais em faixas distintas de pH (4,0; 4,5; 5,3 e 6,0).

• *Síntese dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses*

Para fins comparativos, preparou-se um gel de alginato e quitosana, reticulado com íons cálcio (Alg_Qui). Inicialmente, preparou-se uma solução de quitosana 2% (m/v): 20g de quitosana em 1000mL de solução de ácido acético 2% (v/v); ajustou-se o pH da solução de quitosana para 5,3 com solução de NaOH (10mol/L). Preparou-se 1000mL de uma solução aquosa do polissacarídeo alginato de sódio 2% (m/v). A fim de diminuir a viscosidade do sistema e facilitar a homogeneização do mesmo, as soluções de alginato e quitosana foram aquecidas a 60°C. Lentamente, e sob constante agitação (340rpm), a solução de alginato foi adicionada à solução de quitosana; o sistema permaneceu

sob aquecimento e agitação por mais 60 minutos. Em seguida, o sistema foi congelado (-6°C, por 24h) e liofilizado por 48h. Adicionou-se o material liofilizado em um banho (100mL) de CaCl₂ 2% (m/v), por 15 minutos, para que a reticulação dos grupos -COO⁻ disponíveis acontecesse e se formasse o gel semi-IPN; salienta-se que foi feita uma avaliação prévia a respeito da influência do tempo de contato dos polieletrólitos Alg_Qui com a solução de CaCl₂ (2% m/v) no processo de reticulação: 15min, 1h e 24h. Não foram observadas alterações na estabilidade dimensional das amostras. Por fim, o gel foi lavado com água destilada para a remoção de íons cálcio em excesso, congelado (-6°C, por 24h) e novamente liofilizado por mais 48h.

Para a síntese dos géis semi-IPN alginato/ quitosana e nanoceluloses, fez-se, primeiramente, a dispersão das nanoceluloses (1,14% m/v) em solução de alginato de sódio (2%), utilizando um ultrassom de ponta durante 1 minuto. As massas de nanoceluloses utilizadas no presente estudo estão apresentadas na Tabela IV. 2. As soluções de alginato com as nanoceluloses dispersas e a solução de quitosana foram aquecidas a 60°C. Lentamente, e sob constante agitação, a 340rpm, a solução de alginato foi adicionada à solução de quitosana, assim como realizado para o sistema alginato/ quitosana, sem nanoceluloses. O sistema permaneceu sob aquecimento e agitação por mais 60 minutos e, em seguida, foi congelado e liofilizado por 48h. Adicionou-se o material em um banho de CaCl₂ 2% (m/ v), por 15 minutos, para que a reticulação dos grupos -COO⁻ disponíveis acontecesse e se formassem os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses. Por fim, os materiais reticulados foram lavados com água destilada para a remoção de íons cálcio em excesso e liofilizados por mais 48h.

Tabela IV.2: Reagentes para as sínteses dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses

Amostra	Quitosana (g)	Alginato (g)	Nanocelulose (g)	Razão nanocelulose/Alg+Qui
Alg_Qui (branco)	0,20	0,20	0,00	0,00
Alg_Qui_CNC10	0,20	0,20	0,04	0,10
Alg_Qui_CNC36	0,20	0,20	0,22	0,55
Alg_Qui_CNC50	0,20	0,20	0,40	1,00
Alg_Qui_CNCT10	0,20	0,20	0,04	0,10
Alg_Qui_CNCT36	0,20	0,20	0,22	0,55
Alg_Qui_CNCT50	0,20	0,20	0,40	1,00
Alg_Qui_NFC10	0,20	0,20	0,04	0,10
Alg_Qui_NFC36	0,20	0,20	0,22	0,55
Alg_Qui_NFC50	0,20	0,20	0,40	1,00
Alg_Qui_NFCT10	0,20	0,20	0,04	0,10
Alg_Qui_NFCT36	0,20	0,20	0,22	0,55
Alg_Qui_NFCT50	0,20	0,20	0,40	1,00

Priorizou-se a relação entre as massas das nanoceluloses adicionadas aos sistemas e a massa total de sólidos presentes, sendo:

- Alg_Qui_Nanoceluloses10: 10% de nanocelulose; 90% de alginato+quitosana
- Alg_Qui_Nanoceluloses36: 36% de nanocelulose; 64% de alginato+quitosana
- Alg_Qui_Nanoceluloses50: 50% de nanocelulose; 50% de alginato+quitosana

4.2.4 Caracterização das nanoceluloses, dos géis de alginato e nanoceluloses e dos géis semi-IPNs de alginato/ quitosana e nanoceluloses

Para evidenciar as modificações químicas realizadas nas nanoceluloses (oxidação TEMPO-mediada), confirmar aspectos estruturais e a distribuição de tamanho das mesmas, bem como para avaliar o desempenho dos géis de alginato e nanoceluloses e géis semi-IPNS alginato/ quitosana e nanoceluloses, contendo diferentes quantidades de grupos $-COO^-$, diferentes análises foram realizadas:

- ***Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)***

As imagens de MET foram obtidas no Centro de Microscopia da UFMG, em um microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120kV. As amostras foram preparadas via deposição das nanoceluloses (0,01% m/m) previamente dispersas em grades de transmissão de cobre, recobertas com *Formvar* e contrastadas com uma solução de acetato de uranila 2% (m/v).

- ***Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)***

Para a caracterização morfológica dos géis utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura de feixe duplo – FEI Quanta FEG 3D. As amostras foram previamente criofraturadas utilizando N_2 , para evitar a deformação da matriz na fratura. Em seguida, foram fixadas no suporte e revestidas com um filme contínuo de carbono, com 15nm de espessura. As imagens foram registradas em várias magnificações utilizando o modo de elétrons secundários e uma voltagem de aceleração de 20kV. As micrografias (MEV) também foram usadas para estimar o tamanho médio dos poros dos géis via análise de imagem com o software Image J. Um mínimo de 15 medições foi realizado para cada amostra.

- ***Birrefringência de Fluxo das Suspensões de CNCs***

Imagens birrefringentes de suspensões de CNCT (2% m/v) foram observadas entre dois polarizadores cruzados. As fotografias foram obtidas com uma câmera Canon EDS100 megapixels.

- ***Microtomografia Computadorizada de Raios X (micro-CT)***

Para a análise da morfologia tridimensional dos géis de alginato e nanoceluloses e géis de alginato/quitosana e nanoceluloses as amostras foram primeiramente criofaturadas utilizando N₂, a fim de evitar a deformação da matriz na fratura. Utilizou-se um microtomógrafo SkyScan 1174 (Bruker, Alemanha). Este sistema é equipado com uma fonte de raios X de tungstênio 50KeV / 40W e uma câmera CCD de 1,3 megapixel resfriada acoplada ao cintilador por lente com faixa de zoom 1:6. Projeções foram registradas entre 0 e 360°, em incrementos angulares de 0,50°. Amostras dos géis Alg_CNCT50, Alg_NFCT50, Alg_Qui_CNCT50 e Alg_Qui_NFCT50, com seções transversais de comprimento de borda de ± 12mm foram selecionadas e registradas em 40kV e 800μA. O tamanho do pixel de, aproximadamente, 10μm foi alcançado. A reconstrução da imagem foi realizada usando o algoritmo de Feldkamp. A visualização e análise quantitativa dos volumes reconstruídos foram realizadas usando o software Avizo™ da Thermo Scientific™ (ThermoFisher Scientific, Oregon / USA).

- ***Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier e Reflexão Total Atenuada (FTIR - ATR)***

Os espectros de infravermelho das nanoceluloses e dos géis de alginato e nanoceluloses liofilizados foram registados à temperatura ambiente num espectrômetro Perkin-Elmer Spectrum Version 10.03.02, em comprimentos de onda variando de 4000 a 500cm⁻¹, resolução de 2cm⁻¹ e um acúmulo de 20 varreduras.

- **Análise Termogravimétrica (TGA)**

As análises termogravimétricas das nanoceluloses e dos géis de alginato e nanoceluloses foram realizadas em um equipamento TGA– DTG-60 Shimadzu, aquecidas de 25 até 600°C a uma razão de 4°C.min⁻¹e/ou 10°C.min⁻¹. Utilizou-se um fluxo de N₂ a 200 mL.min⁻¹ e massas das amostras de, aproximadamente, 2,5mg, em cadinho de alumina.

- **Cristalinidade**

Para determinar o índice de cristalinidade (I_C) das nanoceluloses utilizadas no presente estudo e dos géis sintetizados neste trabalho, utilizou-se um difratômetro da Shimadzu, modelo XRD-6000, radiação monocromática Cu K_α (λ = 0,15428nm), voltagem de 30kV e corrente de 30mA. As medidas foram realizadas no modo de varredura contínuo com velocidade de 2°/min no intervalo de ângulo de Bragg (2θ) de 5 a 50°. Os valores do I_C foram estimados de acordo com a equação clássica proposta por Segal *et al.* (1959):

$$I_C(\%) = \frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} \times 100 \quad (4.2)$$

Onde, I₂₀₀ é a intensidade máxima do plano de difração (002) atribuída à região cristalina da celulose e I_{am} é a intensidade de difração em 18° de 2θ (ângulo de Bragg) atribuída à região amorfa da celulose.

- **Determinação do tempo de equilíbrio e grau de inchamento dos géis de alginato e nanoceluloses e dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses**

A fim de avaliar a capacidade de hidratação dos géis de alginato e nanoceluloses e dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses e a influência da porosidade dos mesmos em suas propriedades físico-químicas, ensaios de inchamento em diferentes meios foram realizados (Tabela IV. 3). Primeiramente, foram preparadas soluções tampões fosfatadas, segundo metodologia proposta por Sadahira (2007):

- pH 3: 34,0 g de ortofosfato dihidrogênio de potássio (KH_2PO_4) pesados e solubilizados em 200 mL de água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 3,0 com ácido ortofosfórico. Em seguida, transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 250mL, completou-se o volume com água e homogeneizou-se.
- pH 7,4: dissolveu-se 80,1g de cloreto de sódio (NaCl), 2,0g de cloreto de potássio (KCl), 13,8g de dihidrogenofosfato de sódio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e 3,06g de fosfato monoácido de potássio anidro (K_2HPO_4) em 800mL de água destilada. O pH foi ajustado para 7,4 com adição de NaOH 5mol/L. O volume foi, então, completado para 1000mL com adição de água deionizada.
- pH 9: dissolveu-se 4,35g de ortofosfato dihidrogênio de potássio (KH_2PO_4) em 200mL de água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 9,0 com KOH 1mol/L. Em seguida, transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 250mL e completou-se o volume com água.

Tabela IV. 3: Valores de temperatura e pH utilizados nos ensaios de inchamento dos géis de alginato e nanoceluloses e géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses.

Gel	Temperatura (°C)	pH
Alginato e nanoceluloses	25; 37	6,3 (água milli-Q)
	25; 37	7,4
Alginato/ quitosana e nanoceluloses	25; 37	6,3 (água milli-Q)
	37	3,0
	25; 37	7,4
	37	9,0

Sabe-se que, durante a expansão, o volume do hidrogel aumenta até que se atinja o equilíbrio termodinâmico, no qual os potenciais químicos do solvente dentro e fora do gel são iguais

(KOKUFUTA, 1993). Assim, determinou-se primeiramente o tempo de equilíbrio (ou de estabilização) dos géis estudados em água milli-Q e em tampão fosfato pH 7,4, à 25 e 37°C: amostras secas dos géis foram exatamente pesadas e adicionadas a erlenmeyers contendo 50mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou 50mL de água milli Q. Em intervalos de tempo regulares, as amostras foram recolhidas e pesadas. A remoção do excesso de água superficial foi feita com papel de filtro. O ganho de massa máximo foi calculado conforme equação (4.3):

$$\text{Ganho de massa } \left(\frac{g}{g}\right) = \frac{M_t - M_0}{M_0} \quad (4.3)$$

Onde: M_t representa a massa da amostra inchada no tempo t , e M_0 à massa inicial da amostra antes do inchamento.

Após a determinação do tempo de equilíbrio para algumas amostras dos géis, realizaram-se ensaios de inchamento máximo para os demais géis de alginato e nanoceluloses e géis semi-IPNs alginato/quitosana e nanoceluloses: amostras secas dos géis foram pesadas e adicionadas a erlenmeyers contendo 50mL de água milli-Q ou PBS (pH 3,0; 7,4 ou 9,0) à 37°C, por 2h (tempo superior ao tempo de equilíbrio). Em seguida, as amostras foram recolhidas e pesadas. Utilizou-se papel de filtro para remoção do excesso de água superficial das amostras antes da pesagem. Calculou-se o ganho de massa máximo (g/g), segundo equação 4.3.

- **Análise Mecânica**

O comportamento mecânico dos géis foi estudado a partir de análises termodinâmico-mecânicas (DMTA). As medidas foram realizadas em analisador da NETZSCH, modelo DMA 242 E Artemis, em modo de compressão. Foram utilizados corpos-de-prova com formato irregular e espessura máxima de 6mm. As medidas foram realizadas no intervalo de temperatura entre 20 e 80°C, com taxa de aquecimento de 3°C/ min, frequência constante de 1Hz e carga oscilante de 5N. Determinou-se o módulo de armazenamento (E'), que é uma medida da energia mecânica que o material é capaz de armazenar, em determinadas condições experimentais, na forma de energia potencial ou elástica (WETTON *et al.*, 1986).

A fim de se avaliar a influência de um pós-tratamento térmico nas propriedades mecânicas dos géis, foram realizados dois tipos de ensaios:

- Para o primeiro, dois ciclos consecutivos de aquecimento/ resfriamento foram realizados na mesma amostra, no forno do aparelho de DMTA, a fim de se determinar o módulo de armazenamento para o primeiro e o segundo ciclos de aquecimento/ resfriamento (E'_1 e E'_2), respectivamente. Este ensaio foi realizado para os géis de alginato e nanoceluloses e para os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses
- Em um segundo ensaio, realizado apenas para o gel de alginato e nanofibras de celulose (50% m/m), amostras do gel foram termicamente tratadas em estufa, a 80°C, durante 1 hora ou 4 horas.
- Todas as medidas foram realizadas em duplicata.

Para os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses o comportamento mecânico foi também estudado a partir de análises termomecânicas (TMA). As medidas foram realizadas no Laboratório de Físico-Química da PUC MINAS, em um equipamento TMA-60H – Shimadzu. Foram utilizados corpos de prova com formato retangular e dimensões variáveis. As medidas foram realizadas no intervalo de temperatura entre 20 e 70°C, com taxa de aquecimento de 2°C/min, frequência constante de 1Hz, carga inicial (em massa) igual a 50g e diâmetro da ponteira igual a 3,3mm. A fim de se avaliar a influência de um tratamento térmico nas propriedades mecânicas dos géis semi-IPNs de alginato/ quitosana e nanoceluloses, foram realizados 2 ciclos de aquecimento para uma mesma amostra e o efeito da concentração e do tipo de nanocelulose adicionada aos géis de alginato, nas propriedades finais dos mesmos, também foi avaliado.

- *Ensaio de citotoxicidade e crescimento de células dos géis de alginato e nanoceluloses e géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses*

Sabendo da importância do ambiente extracelular na regulação do comportamento das células e da grande aplicabilidade dos géis de alginato e quitosana para cultura celular, ensaios de citotoxicidade e crescimento de células foram realizados para os materiais sintetizados no presente estudo: géis de

alginato e nanoceluloses e géis semi-IPNs de alginato/ quitosana e nanoceluloses, visando aplicação em engenharia de tecidos.

Teste de citotoxicidade in vitro: A citotoxicidade das células de fibroblastos L929 foi avaliada usando um ensaio MTT após 24, 48 e 96h de tratamento e avaliada tanto pelo ensaio de contato direto como pelo ensaio de contato indireto em conformidade com ISO-10993-5 (Avaliação biológica de dispositivos médicos - Parte 5: testes para citotoxicidade *in vitro*) conforme descrito por (PARIENTE *et al.*, 2002 e DOMINGUES *et al.*, 2014). A viabilidade celular foi expressa como uma percentagem da viabilidade detectada para as células tratadas (com o contacto de gel) *versus* a viabilidade das células incubadas com meio de ensaio de cultura (não tratado). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (n = 6).

Para o ensaio de contato direto, as células foram colocadas em uma placa de cultura de 96 poços, a uma densidade de 6×10^3 células/ poço e incubadas por 24h. Os géis foram cortados em pedaços de $5 \times 5 \times 1 \text{mm}^3$ e esterilizados por irradiação UV por 30min. Em seguida, os géis foram colocados sobre uma camada de células de fibroblastos e incubados por 96h. As amostras foram avaliadas às 24, 48, 72 e 96h, respectivamente. Subsequentemente, em cada intervalo de tempo, os géis e o meio de cultura de células foram removidos e os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril. Adicionou-se 10% de solução de MTT a cada poço e, após 4h, os sais formados foram solubilizados em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS), a 1% (m/m). A absorbância do conteúdo de cada poço foi medida a 570nm usando um espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan Spectrum MCC / 340.

O ensaio de contato indireto ou teste de eluição foi realizado usando os géis extraídos do meio de cultura celular. O extrato foi preparado embebendo os géis em meio de cultura DMEM com alto teor de glicose, durante 48h e, subsequentemente, filtrado através de um filtro de seringa de 0,22mm para esterilizar a mistura. Os extraíveis das amostras (que migraram para o meio nutriente) foram colocados em uma camada de células e incubados por 24, 48, 72 e 96h. Posteriormente, em cada intervalo de tempo, o meio de cultura das células foi removido, e o teste de MTT foi realizado de forma semelhante à descrita para o método do contato direto.

Proliferação e fixação celular: A proliferação e fixação de células nos géis foram avaliadas por imagens de microscopia eletrônica de varredura. As células foram semeadas em amostras de gel, cortadas em um pedaço de $5 \times 5 \times 1 \text{ mm}^3$ e esterilizadas por irradiação UV por 30min. Antes da sementeira de células, os géis foram imersos em FBS durante 1h e depois semeados com suspensão de células de fibroblastos a uma densidade de 5×10^6 células/ mL. O material permaneceu incubado, a 37°C , em atmosfera de CO_2 , durante 7 dias. No final do período de incubação, os géis contendo as células foram lavados cuidadosamente com PBS e fixados com glutaraldeído a 2,5% a 37°C . As amostras secas foram imersas em gradiente de etanol (10, 20, 40, 60, 80 e 100%) e secas a vácuo, em um dessecador. Por fim, foram revestidas com ouro, a uma taxa de deposição muito baixa e analisadas usando um microscópio eletrônico de varredura Quanta FIB EGF 3D, FEI.

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO: GÉIS DE ALGINATO E NANOCELULOSES E GÉIS SEMI-IPNs ALGINATO/ QUITOSANA E NANOCELULOSES

Este capítulo foi dividido em três seções: no item 5.1 apresenta-se a caracterização das nanofibras e nanocristais de celulose, funcionalizados e sem modificação química, utilizados na síntese dos géis. Nos itens 5.2 e 5.3, estão apresentados e discutidos os resultados experimentais referentes à síntese e caracterização dos géis de alginato e nanoceluloses e alginato/ quitosana e nanoceluloses visando possíveis aplicações biomédicas.

5.1. Caracterização e funcionalização de nanoceluloses

As nanoceluloses, além de excelentes propriedades mecânicas, apresentam também outras características interessantes para a síntese de géis compósitos funcionais, como biocompatibilidade e alta reatividade (ZIMMERMANN *et al.*, 2010). As suas características morfológicas, carga superficial e teor de cristalinidade têm influência direta nas propriedades físico-químicas e biológicas dos géis de alginato e géis semi-IPNs de alginato e quitosana.

Para confirmar aspectos estruturais das nanoceluloses e evidenciar as modificações químicas desenvolvidas no presente estudo (oxidação das hidroxilas primárias de NFC e CNC) foram realizadas análises de birrefringência de fluxo dos CNCs, microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de *Fourier* e Reflexão Total Atenuada (FTIR - ATR), difração de raio-X (DRX) e análises térmicas (TGA– DTG, em atmosfera de N₂) das nanoceluloses TEMPO-oxidadas e sem modificação química. Realizou-se também uma titulação condutimétrica das nanoceluloses TEMPO-oxidadas, a fim de determinar o grau de oxidação (GO) dos grupos hidroxilas das nanoceluloses modificadas.

- ***Birrefringência de fluxo dos CNCs***

O comportamento anisotrópico dos nanocristais de celulose é comprovado pela formação de imagens birrefringentes quando dispersões aquosas são observadas entre polarizadores cruzados (Figura 5.1). O aparecimento de birrefringência de fluxo é resultado de uma organização induzida dos CNCs em suspensão.



Figura 5.1: Imagens iridescentes de dispersões de CNC em água, com concentração de aproximadamente 2% (m/v).

A imagem apresentada na Figura 5.1 comprova a ordenação das partículas de CNC em meio líquido e sugere a incorporação de grupos sulfatos na superfície dos CNCs e/ou carboxilatos na superfície dos CNCT, durante o processo de hidrólise ácida e oxidação mediada por TEMPO (confirmados por análises de FTIR e titulação condutimétrica). A presença de cargas na superfície dos CNC/ CNCT garante a formação de suspensões estáveis.

O arranjo anisotrópico é formado devido à presença destas cargas na superfície dos nanocristais e a morfologia em forma de bastão dos CNCs. A transição de fase (isotrópica/ anisotrópica) também depende da forma geométrica dos nanocristais, do tamanho e da razão de aspecto (AZIZI SAMIR *et al.*, 2005).

- **Caracterização morfológica**

As imagens obtidas por MET têm como objetivo quantificar as dimensões das nanoceluloses e observar a sua morfologia. A Figura 5.2 apresenta as micrografias dos nanocristais e nanofibras de celulose sem modificação química e nanoceluloses TEMPO-oxidadas, utilizadas no presente estudo.

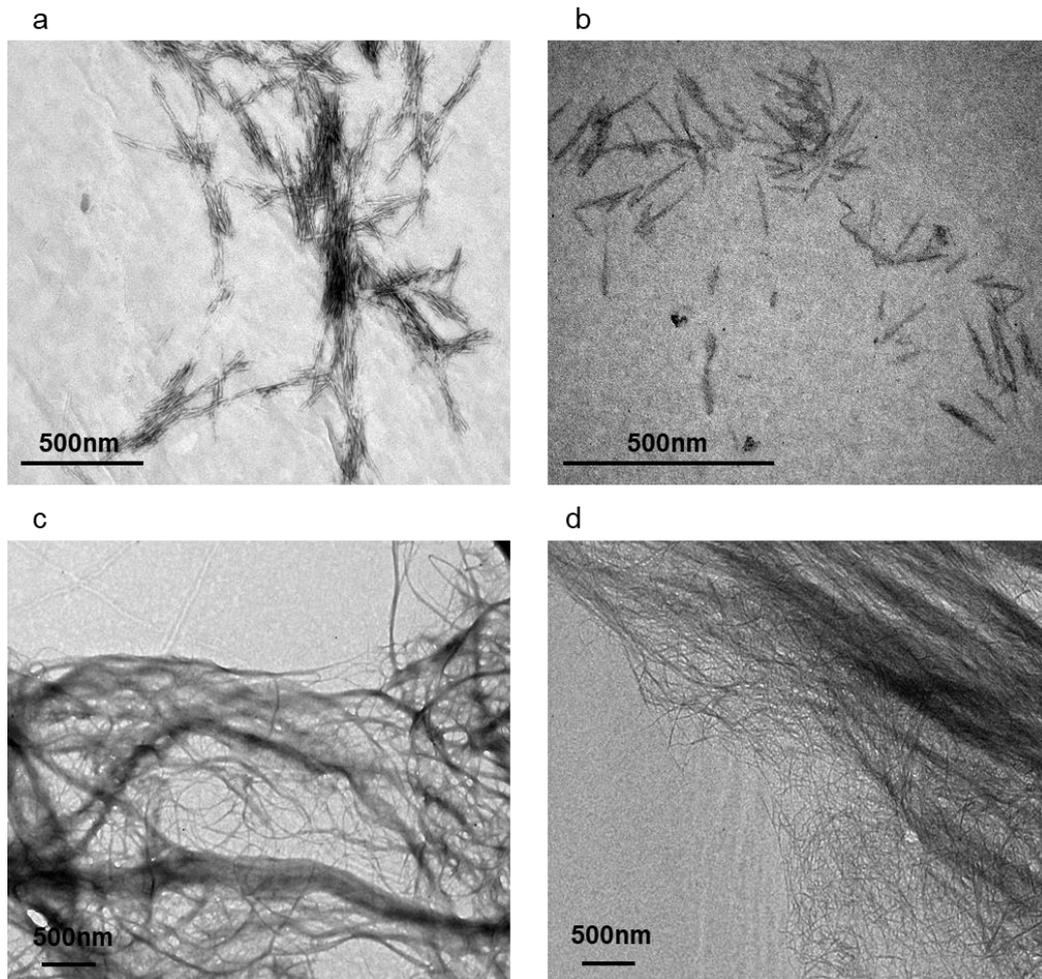


Figura 5.2: Características morfológicas das amostras das nanoceluloses não modificadas e nanoceluloses TEMPO-oxidadas - imagens obtidas por MET dos CNCs (a); CNCT (b); NFCs (c); NFCT (d).

A partir da análise da Figura 5.2 (a-b) pode-se observar que os CNCs exibiram uma morfologia típica de um bastão, com um comprimento de $170\pm 15\text{nm}$ e um diâmetro médio de $4\pm 1\text{nm}$. Após a

modificação TEMPO, não foram observadas alterações significativas na morfologia dos CNCs, como relatado na literatura (LIN *et al.*, 2011; NASERI *et al.*, 2016). Ressalta-se que, devido às limitações da tecnologia de refinamento usada para produzir nanofibras de celulose, foi possível ter fibras celulósicas residuais nas suspensões de nanofibras, aplicando-se até 10 kWh/ kg de celulose no processo de extração. No entanto, as análises microscópicas revelaram que a maioria estava fibrilada. A aglomeração nas amostras de CNC é justificada pelas fortes interações intermoleculares devido à presença dos grupos hidroxilas na superfície e a elevada área superficial específica das nanoceluloses. Porém, para as NFCs (Figura 5.2 c-d) pode-se observar um maior grau de entrelaçamento e agregação se comparadas aos CNC. Esta diferença deve-se à maior razão de aspecto (L/D) das NFC, que apresentaram um diâmetro médio entre 30 e 50nm e 2-5 μ m de comprimento. Esse resultado é semelhante ao observado por Dufresne (2013). Além disso, as NFCs são capazes de emaranhar e apresentar mais interações entre os grupos hidroxila superficiais, quando comparadas aos CNCs. Após a oxidação mediada por TEMPO, as NFCT tiveram suas dimensões laterais reduzidas (diâmetro médio entre 5 e 10nm), mantendo seu comprimento em escala micrométrica, como também relatado por Sehaqui *et al.* (2012).

Cabe salientar que os valores das dimensões das nanoceluloses, principalmente das NFC/ NFCT, podem ter sido mascarados pela formação de aglomerados.

- ***Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier e Reflexão Total Atenuada (FTIR - ATR)***

Os espectros de FTIR-ATR fornecem informações importantes sobre vibrações moleculares presentes no material. Com o objetivo de determinar os grupos funcionais das nanoceluloses e confirmar a reação de oxidação dos grupos hidroxilas primárias da superfície das nanofibras e nanocristais de celulose (através da reação de oxidação mediada por TEMPO) análises de infravermelho das amostras foram realizadas. Os espectros obtidos estão apresentados na Figura 5.3.

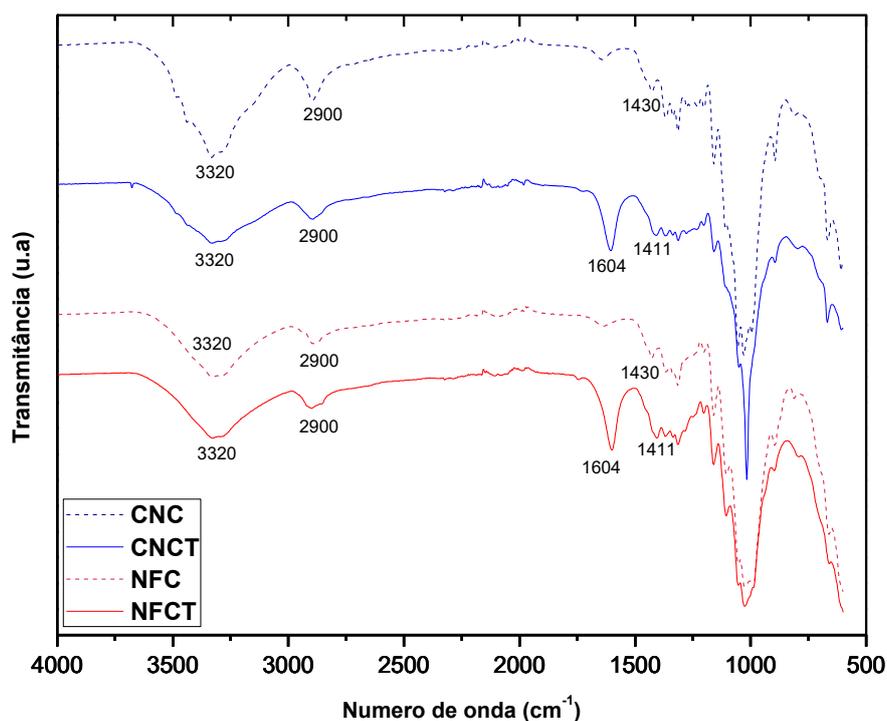


Figura 5.3: Espectros de FTIR das nanoceluloses – CNC, CNCT, NFC e NFCT.

A partir da análise da Figura 5.3 pode-se observar algumas alterações no espectro de FTIR das nanoceluloses modificadas (CNCT e NFCT): a mais importante é o aparecimento da banda de estiramento simétrico dos grupos carbonila (C=O) de ácido carboxílico, aproximadamente, 1604cm^{-1} , confirmando a oxidação de grupos hidroxila das NFC e CNC; em 1411cm^{-1} tem-se o estiramento assimétrico dos grupos $-\text{COO}^-$. Também pode ser observada a redução das bandas relacionadas com ligações de hidrogênio que intensificam a vibração de grupos $-\text{OH}$ em torno de 3300cm^{-1} .

O espectro das NFC com o espectro dos CNC são similares: apresentam uma banda larga em 3.300cm^{-1} correspondente ao estiramento das ligações O-H; em 2.900cm^{-1} tem-se o estiramento das ligações dos grupos C-H e deformação de grupos metila (CH_2) em torno de 1430cm^{-1} , bandas características de materiais celulósicos (REDDY *et al.* 2009); as absorções localizadas em torno de 1200 e 920cm^{-1} são atribuídas à estrutura sacarídea. Porém, em aproximadamente 1370cm^{-1} e

1239cm⁻¹ pode-se observar pequenas diferenças nos espectros das NFC/ NFCT em relação aos espectros dos CNC/ CNCT. Tais diferenças podem estar associadas à deformação angular das ligações CH das hemiceluloses presentes nas nanofibras (PASTORE *et al.*, 2008) e aos estiramentos C-O dos grupos acetil das hemiceluloses (ISAAC *et al.*, 2018).

As absorções dos grupos éster sulfatos (introduzidos na superfície dos CNCs durante a hidrólise com ácido sulfúrico), em geral, são pouco intensas e nenhuma banda característica é observada no espectro. Segundo Podsiadlo *et al.* (2005), os nanocristais de celulose podem apresentar vibração da ligação S = O na faixa de 1.205cm⁻¹ em função das regiões sulfatadas remanescentes da hidrólise ácida; devido ao pequeno número de hidroxilas que são substituídas por grupo sulfato, em torno de 1%, esse sinal não aparece de maneira acentuada.

- ***Difração de raios-X e análise da cristalinidade***

Os diferentes métodos de medidas de cristalinidade, exaustivamente descritos na literatura, são normalmente utilizados como metodologias comparativas entre a cristalinidade da celulose e das nanoceluloses. Aplica-se também para avaliar a cristalinidade das nanoceluloses após reações de modificação química, a fim de se comparar com a cristalinidade do material precursor.

As nanofibras de celulose são originadas a partir da desintegração mecânica das fibras celulósicas, sobretudo de suas superfícies, promovendo o rompimento da parede celular e a posterior exposição das fibrilas e microfibrilas, anteriormente situadas no interior das fibras (TURBAK *et al.*, 1983). Os nanocristais são obtidos por meio de hidrólise ácida, onde se tem a extração das regiões amorfas das fibrilas elementares de celulose, restando apenas as regiões cristalinas (JIANG *et al.*, 2013). A Figura 5.4 apresenta o difratograma das nanoceluloses sem modificação química e das nanoceluloses TEMPO-oxidadas.

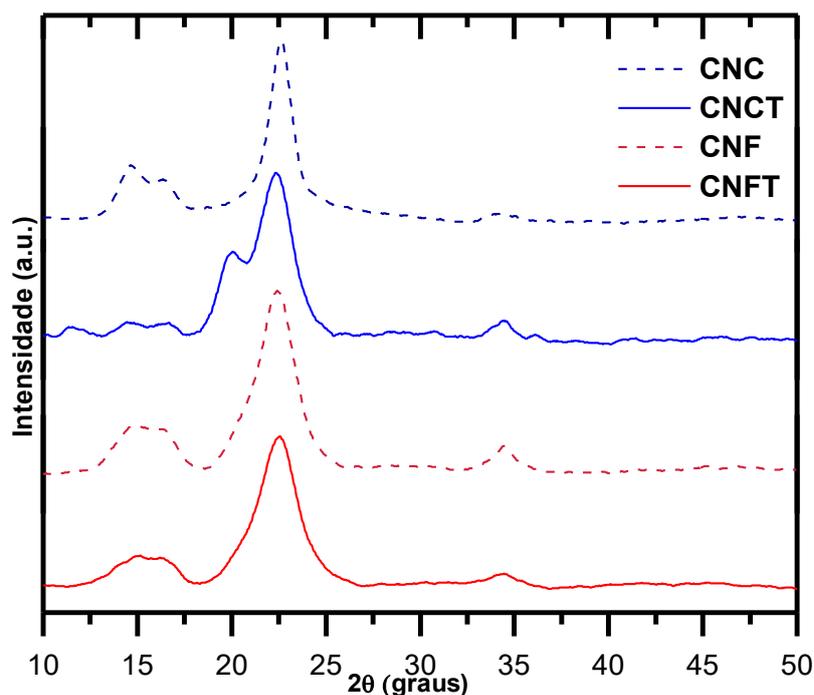


Figura 5.4: Difratograma das nanoceluloses - CNC, CNCT, NFC e NFCT.

As análises de DRX das nanoceluloses (Figura 5.4) mostram que a funcionalização química das superfícies dos CNCs e NFCs preservou a cristalinidade das nanoceluloses.

Para todas as amostras analisadas, dois picos de difração principais, característicos da celulose tipo I, foram observados: pico de intensidade máxima em $2\theta = 22,5^\circ$, que corresponde ao plano cristalográfico (200), e em $2\theta = 15,3^\circ$, correspondente ao plano (110). Pode-se observar ainda um pico bem definido em $2\theta = 34,5^\circ$, referente ao plano (040) (LAHIJI *et al.*, 2010).

Para as amostras de CNCT pode-se observar um ombro localizado ao redor de $2\theta = 21^\circ$ que representa uma reflexão do plano (102/012) (LAHIJI *et al.*, 2010). Esta estrutura cristalina corresponde ao arranjo paralelo de duas cadeias glicosídicas e tem sido referida como o polimorfo da celulose de maior resistência mecânica (PÄÄKÖ *et al.*, 2007). Sugere-se, portanto, que o tratamento químico de

oxidação TEMPO-medidada tem influência sobre a estrutura cristalina dos CNCs, levando à organização do polimorfo tipo II da celulose.

A partir do difratograma (Figura 5.4), calculou-se o índice de cristalinidade (I_C) das nanoceluloses e os valores obtidos estão apresentados na Tabela V.2. Valores de I_C superiores a 80% foram encontrados para os CNCs e de, aproximadamente, 60% para as NFCs, que formam redes fisicamente emaranhadas em concentrações extremamente baixas (<1% m/m). Tais resultados são semelhantes aos descritos por AULIN *et al.* (2009) e De FRANCE *et al.* (2017).

Tabela V.2: Índices de cristalinidade dos CNC, CNCT, NFC e NFCT através dos espectros de DRX.

Amostra	I_C (%)
CNC	90
CNCT	82
NFC	63
NFCT	61

Como esperado, os CNC/ CNCT apresentaram I_C maior que as NFC/NFCT devido à remoção das regiões amorfas da celulose durante a hidrólise ácida. Demonstrou-se, portanto, a preservação da morfologia das nanoceluloses e sua integridade cristalina após as reações de oxidação mediadas por TEMPO.

- **Análise termogravimétrica –TGA/ DTG**

Com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica das nanoceluloses utilizadas no presente estudo, antes e após a reação de oxidação TEMPO, análises termogravimétricas foram realizadas. As curvas de TGA mostram a perda de massa das amostras, em porcentagem, em função do aumento da temperatura e as curvas de DTG (termogravimetria derivada) possibilita identificar em quantas etapas

a degradação térmica está ocorrendo. Os resultados encontrados para análises realizadas em atmosfera de N₂ estão apresentados nas Figuras 5.5 e 5.6.

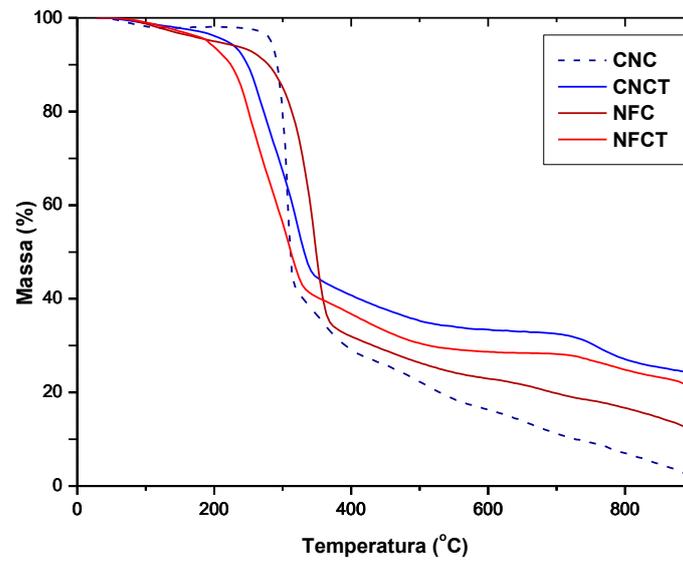


Figura 5.5: Curvas de TGA das nanoceluloses – CNC, CNCT, NFC e NFCT, em atmosfera de N₂.

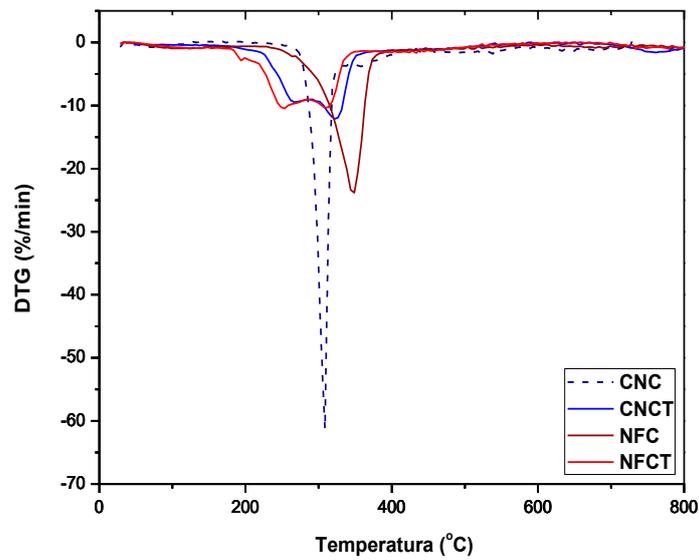


Figura 5.6: Curvas de DTG das nanoceluloses – CNC, CNCT NFC e NFCT, em atmosfera de N₂.

As curvas de degradação termogravimétricas para as NFC e CNC são similares (Figuras 5.5 e 5.6), uma vez que as composições químicas também são similares; a presença de possíveis grupos sulfatos nas superfícies dos nanocristais (em função da hidrólise com ácido sulfúrico) pode alterar as temperaturas de degradação máxima, acelerando as reações (ROMAN e WINTER, 2004). Além destes, as hemiceluloses presentes na estrutura da NFC provocam diminuição nas temperaturas iniciais de degradação destas amostras (YANG *et al.*, 2007). Liao (2003) sugere que o pico de perda de massa para a celulose é posterior à degradação térmica das hemiceluloses, devido à maior quantidade de energia necessária para a despolimerização da cadeia de celulose e para a quebra de seus monômeros.

Como também apresentado nas Figuras 5.5 e 5.6, as curvas de TGA/ DTG das nanoceluloses estudadas apresentam três principais estágios de perda de massa. Em todas as amostras, pode-se observar um primeiro estágio de perda de massa em temperaturas entre 20 e 200°C, referente à evaporação de água ou decomposição de algumas moléculas de baixa massa molar.

Em um segundo estágio, de 220 a 390°C, tem início o processo de despolimerização da celulose, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas, com principal perda de massa de cerca de 55% para os CNC e CNCT, 64% para NFC e 55% para NFCT.

O terceiro estágio ocorre devido à degradação de resíduos carbônicos para formação de produtos gasosos de baixa massa molar. A temperatura inicial de degradação das nanoceluloses, em atmosfera de N₂, é de, aproximadamente, 295°C para os CNCs e 270°C para as NFC, enquanto que, para os CNCT é cerca de 240°C e para as NFCT, 220°C. Segundo Isogai *et al.* (2011), a formação de carboxilatos de sódio a partir das hidroxilas primárias C6 na superfície das nanoceluloses, devido à oxidação mediada por TEMPO, leva a uma diminuição significativa no ponto inicial de degradação térmica; presença de Na⁺ (a partir da formação de carboxilatos de sódio) aumenta também o percentual de resíduos após 800°C para os CNCT e NFCT.

- *Grau de oxidação das nanoceluloses TEMPO-oxidadas (CNCT e NFCT)*

O grau de oxidação ou quantidade total de grupos carboxílicos presentes nas nanoceluloses TEMPO-oxidadas foi determinado por titulação condutimétrica, segundo metodologia proposta por Isogai e Saito (2004). Os resultados encontrados para a titulação estão apresentados na Figura 5.7 e Tabela V.3. A partir dos dados obtidos pela titulação condutimétrica, calculou-se o GO das nanoceluloses que também se encontram na Tabela V.3.

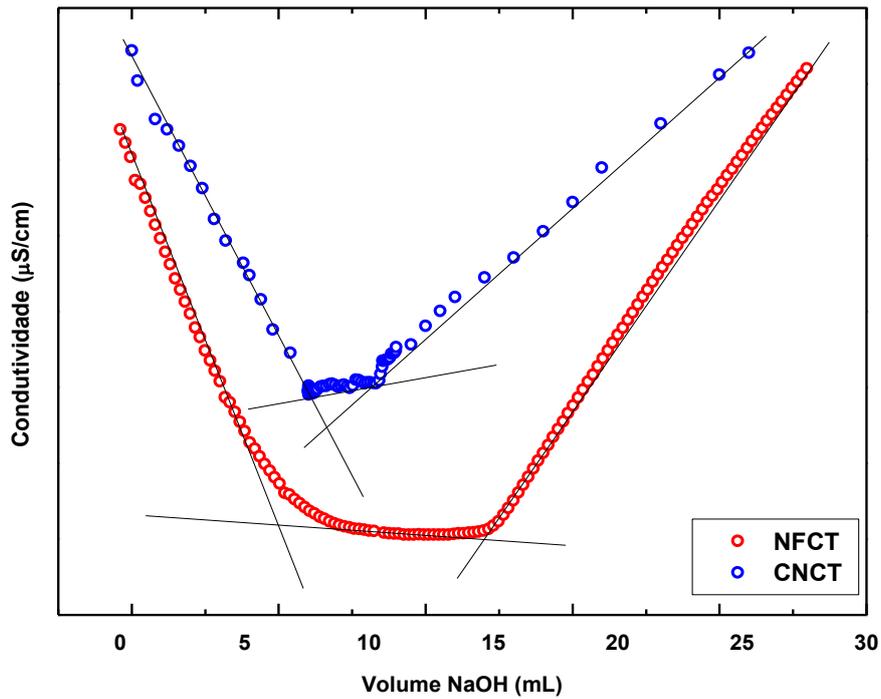


Figura 5.7: Titulação condutimétrica para os CNCT e NFCT.

Tabela V.3: Volumes de NaOH (0,01mol/L) consumidos durante a titulação condutimétrica das nanoceluloses TEMPO-oxidadas, valores das massas de nanoceluloses seca utilizadas nos ensaios e grau de oxidação (GO) das NFCT e CNCT.

Nanocelulose	V ₁ (mL)	V ₂ (mL)	V ₁ -V ₂ (mL)	M seca (g)	GO (mmol/g celulose)
NFCT	6,419	14,649	8,230	0,07	1,210
CNCT	7,584	10,152	2,568	0,05	0,513

Sugere-se, a partir do resultado obtido para o grau de oxidação das NFCT, que quase todos os grupos hidroxilas primários da superfície das NFC sejam acessíveis à reação de oxidação TEMPO mediada. Saito *et al.* (2007), em reação de oxidação de NFC catalisada por TEMPO, semelhante à reação de modificação de NFC utilizada no presente estudo, reportam a produção de nanofibras de celulose altamente individualizadas (diâmetros uniformes entre 3-4 nm e comprimentos na ordem de alguns microns), para as fibras com grau de oxidação de aproximadamente 1,5mmol/g.

Para os CNCT encontrou-se um grau de oxidação menor (0,513mmol/g celulose) quando comparado ao grau de oxidação encontrado para as NFCT. Tal resultado é esperado, devido à menor reatividade das regiões cristalinas dos CNC (SAITO *et al.*, 2004). Ressalta-se também que as NFCT foram obtidas a partir da desintegração mecânica da polpa de celulose previamente oxidadas; os CNCT foram obtidos a partir da oxidação direta dos CNC.

5.2 Géis de alginato e nanoceluloses

Géis de alginato reticulados com íons cálcio (a partir das interações eletrostáticas entre os grupos carboxilatos do alginato e os íons Ca²⁺) apresentam elevada porosidade e são conhecidos por suas propriedades curativas e antitumorais. Porém, são instáveis em pH fisiológico ou em ambientes com alta concentração de fosfato ou citrato, uma vez que estes extraem o Ca²⁺ da estrutura, dissolvendo o sistema (TAQIEDDIN e AMIJI, 2004). Visando melhorar propriedades mecânicas e estruturais dos géis de alginato, sem comprometer a biocompatibilidade do material, nanofibras e nanocristais de celulose TEMPO-oxidados e sem modificação química foram adicionados às soluções de alginato

(2% m/v). Para demonstrar o mecanismo de reticulação dos géis de alginato com os diferentes tipos de nanoceluloses e íons Ca^{2+} , desenvolveu-se o esquema 1 (representado pela Figura 5.8)

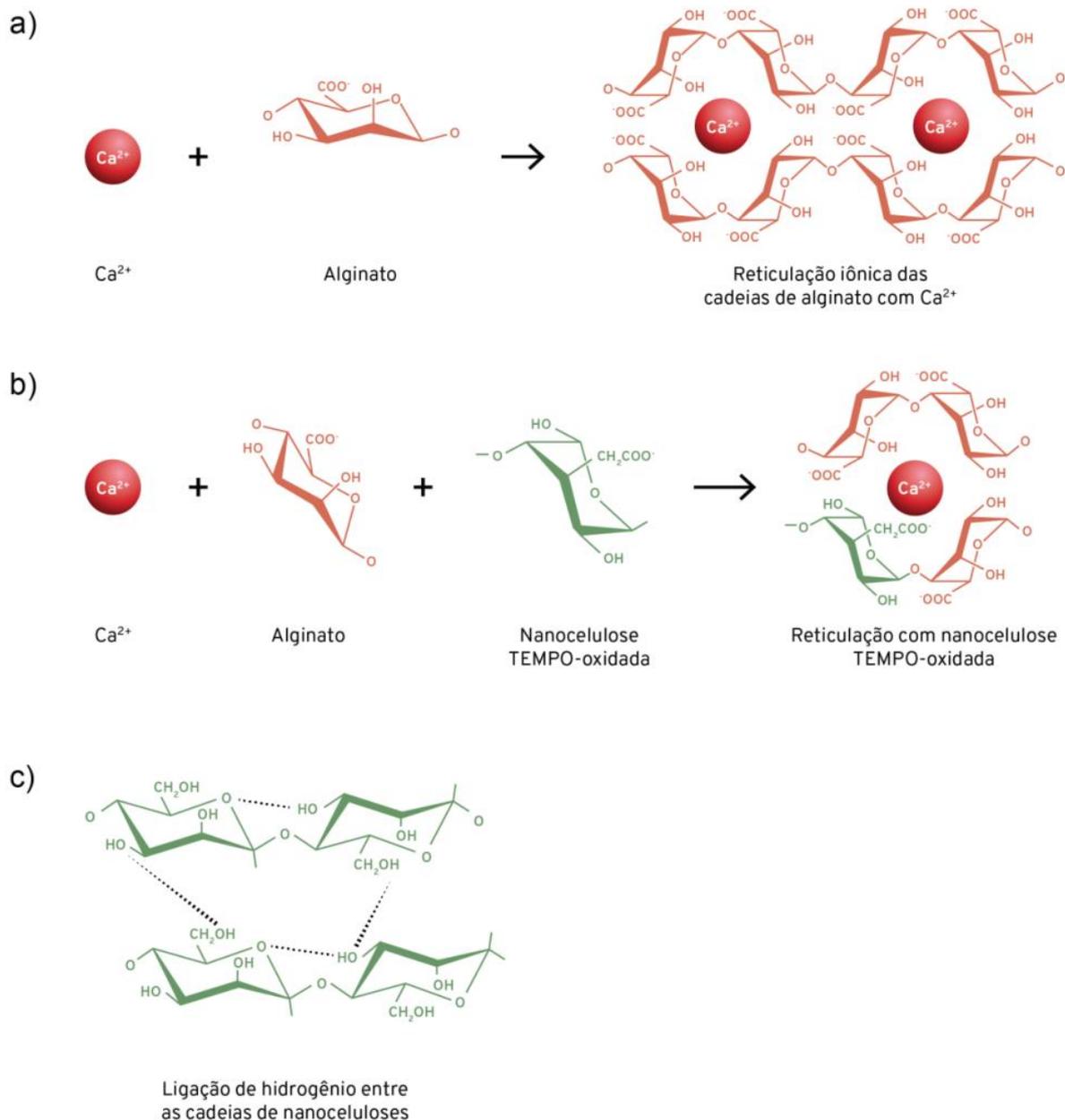


Figura 5.8: Representação esquemática das possíveis interações entre as cadeias de alginato, as nanoceluloses e os íons Ca^{2+} presentes no sistema – reticulação iônica entre os grupos $-\text{COO}-$ das

cadeias de alginato e íons Ca^{2+} (a); reticulação iônica entre os grupos $-\text{COO}-$ das cadeias de alginato e das nanoceluloses TEMPO-oxidadas e íons Ca^{2+} (b); ligações de hidrogênio entre as cadeias das nanoceluloses (c).

O tipo de nanocelulose (NFC, NFCT, CNC e CNCT) adicionada ao sistema e a concentração das mesmas influenciaram na estabilidade dimensional dos géis de alginato e o estudo dessa propriedade, importante para diversas aplicações, encontra-se decrito a seguir.

- ***Influência do tipo de nanocelulose na estabilidade dimensional dos géis de alginato e nanoceluloses***

A fim de ilustrar/ demonstrar a participação dos diferentes tipos de nanoceluloses na estabilidade dimensional dos géis de alginato e nanoceluloses apresenta-se as Figuras 5.9 e 5.10.

A Figura 5.9 propõe um esquema para a formação dos géis de alginato e nanoceluloses oxidadas (Alg_NFCT e Alg_CNCT), ilustrando as possíveis reticulações iônicas entre os grupos $-\text{COO}^-$ disponíveis nos sistemas e os íons Ca^{2+} . Ressalta-se que, para o presente esquema, meramente ilustrativo, não foram consideradas as proporções entre as dimensões das NFCT e CNCT.

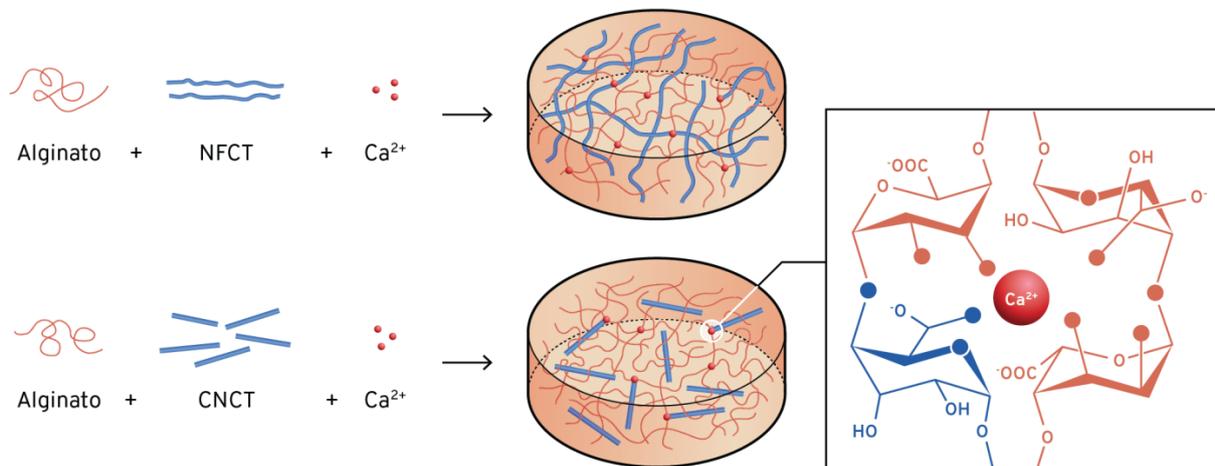


Figura 5.9: Representação esquemática dos géis de alginato e nanoceluloses TEMPO-oxidadas.

A Figura 5.10 apresenta imagens dos géis Alg_NFC36, Alg_NFCT36, Alg_CNC36 e Alg_CNCT36.

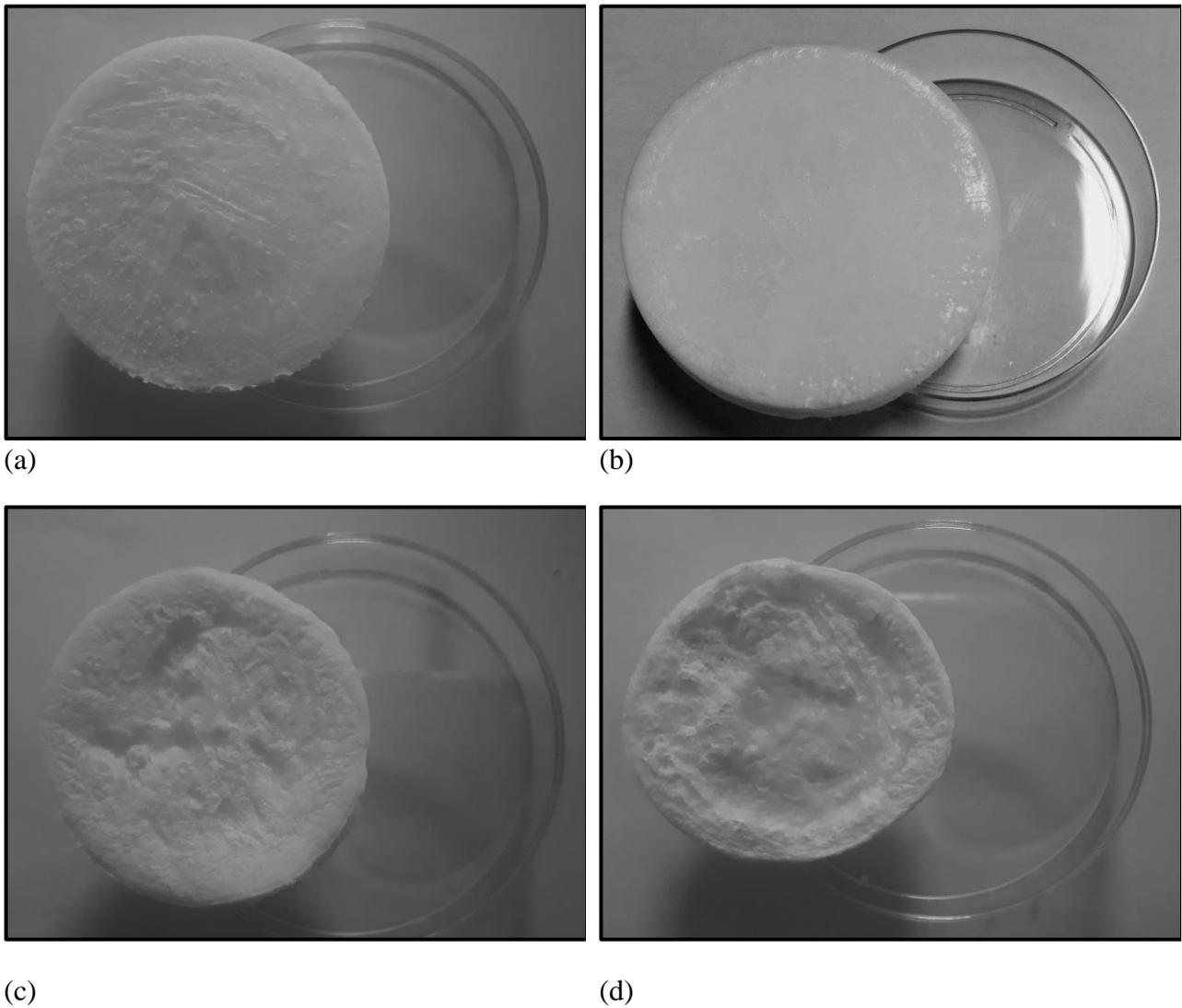


Figura 5.10: Imagem dos géis de alginato e nanoceluloses sem modificação química e nanocelulose TEMPO-oxidadas - Alg_NFC36 (a), Alg_NFCT36 (b), Alg_CNC36 (c) e Alg_CNCT36 (d).

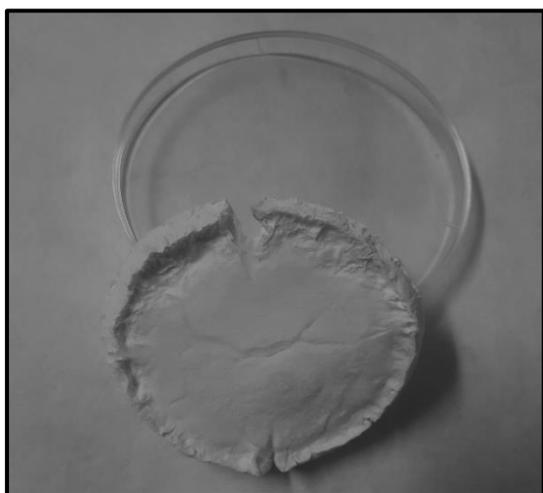
Sabe-se que as nanofibras não modificadas (NFC) e as nanofibras TEMPO-oxidadas (NFCT) possuem as cadeias mais longas (μm) e flexíveis (parte amorfa) quando comparadas aos nanocristais.

São capazes de formar uma rede de materiais que se entrecruzam e influenciam positivamente nas propriedades estruturais dos géis (De FRANCE *et al.*, 2017). Além disso, as NFCT, por possuírem grupos carboxilatos, podem participar da reticulação dos géis e também da construção estrutural dos mesmos, conferindo uma maior estabilidade dimensional (Figuras 5.10a e 5.10b). Segundo Lin *et al.* (2012), as NFCT podem formar uma rede polimérica semi-interpenetrante com os géis de alginato.

Os CNC/ CNCT destacam-se por favorecer o mecanismo de gelificação e aumentar a resistência mecânica dos materiais (ZHANG *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2011). A intensa rede de ligações de hidrogênio estabelecidas entre os nanocristais e a sua morfologia corroboram para um aspecto frágil e quebradiço (Figuras 5.10c e 5.10d). Os filmes de CNC e CNCT são quebradiços e essa característica pode ser transferida aos novos materiais formados (De FRANCE *et al.*, 2017). Além disso, durante a etapa de liofilização, a água (solvente na síntese dos hidrogéis) foi eliminada. As cadeias de alginato se aproximaram, assim como as cadeias dos CNC, CNCT. Portanto, sugere-se também uma agregação lateral dos nanocristais em função dos grupos hidroxilas e da elevada área superficial dos mesmos, com conseqüente redução de volume e menor estabilidade dimensional.

- ***Influência da concentração das nanoceluloses na estabilidade dimensional dos géis de alginato e nanoceluloses***

Sabendo que a estabilidade dimensional dos géis é diretamente proporcional à concentração de CNC/CNCT ou NFC/NFCT (agentes de reforço), os géis de alginato com a menor concentração em massa das nanoceluloses (10% m/m) apresentaram heterogeneidade e menor estabilidade dimensional quando comparados aos demais géis de alginato e nanoceluloses desenvolvidos no presente estudo (com 36% ou 50% (m/m) de CNC/ CNCT ou NFC/NFCT). Como conseqüência, houve contrações no volume final dos géis e formação de trincas macroscópicas após a etapa final de liofilização do material, conforme apresentado na Figura 5.11 (a-b). Sendo assim, para as análises de FTIR, DRX, micro-CT, DMTA e citotoxicidade dos materiais, foram selecionadas amostras dos géis de alginato contendo 36% ou 50% (m/m) de nanoceluloses.



(a)



(b)

Figura 5.11: Imagem dos géis Alg_NFCT10 (a) e Alg_CNCT10 (b).

A maior estabilidade dimensional apresentada pelos géis de alginato e nanoceluloses em maiores concentrações em massa (36% e 50% m/m) pode ser justificada pela presença de cargas nas superfícies das fibras que favoreceram a dispersão das mesmas nas soluções de alginato, além de participarem do processo de reticulação iônica com íons Ca^{2+} (CHINGA-CARRASCO, 2018). Segundo Naseri *et al.* (2016), a introdução de nanoceluloses modificadas na matriz de alginato possibilita a participação das mesmas como componente estrutural essencial nos hidrogéis de alginato, podendo, portanto, formar uma rede tridimensional regular reticulada juntamente com o alginato. Dufresne (2012) também reporta que em materiais poliméricos reforçados com nanoceluloses há uma concentração “ótima” onde estas nanoceluloses podem se conectar e formar estruturas mais longas, com significativas melhorias nas propriedades finais do material. Tal um fenômeno foi classificado como rede de percolação e é diretamente influenciado pelas ligações entre as nanoceluloses e pela morfologia das mesmas (Figura 5.12).

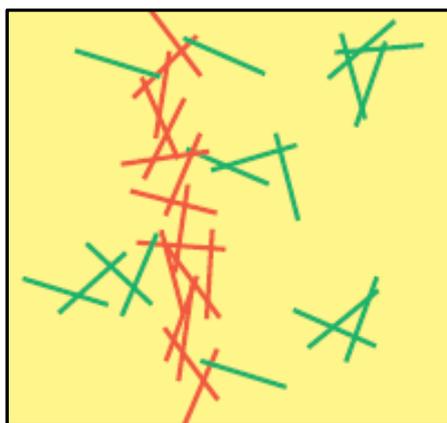


Figura 5.12: Representação esquemática de uma rede de percolação de CNC. Os bastões vermelhos correspondem aos CNC em redes percoladas e os bastões verdes aos CNC que não estão em redes de percolação. (Adaptada – DUFRESNE, 2012).

5.2.1 Caracterização física, química e biológica dos géis de alginato e nanoceluloses

- *Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier e Reflexão Total Atenuada (FTIR - ATR)*

Reações de reticulação são, em geral, utilizadas para formar redes poliméricas com propriedades físico-químicas diferenciadas. A fim de confirmar interações físicas entre as cadeias de alginato, íons cálcio e as nanoceluloses presentes no sistema em estudo, análise de espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas. A Figura 5.13 apresenta espectros de infravermelho para o polímero alginato, para o gel de alginato puro (Alg_Ca²⁺) e para os géis de alginato e nanoceluloses 36% (m/m).

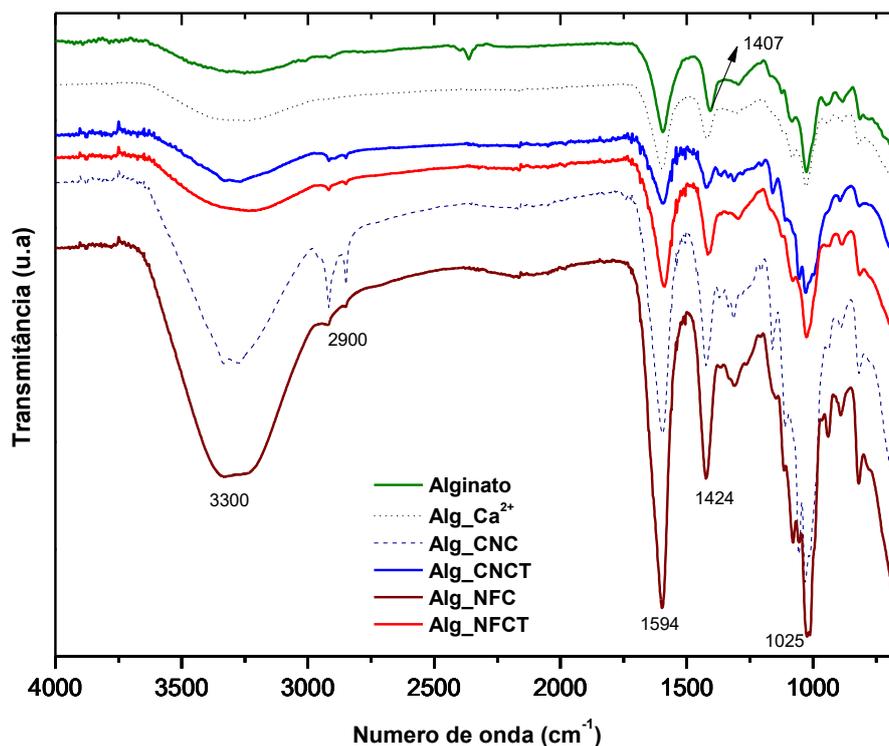


Figura 5.13: Espectros de FTIR- ATR para o polímero alginato de sódio, gel de alginato puro (Alg_Ca^{2+}) e géis de alginato e nanoceluloses (Alg_CNC36 ; Alg_CNCT36 ; Alg_NFC36 ; Alg_NFCT36).

Os espectros ATR-FTIR dos géis de alginato (Alg_Ca^{2+}) e alginato e nanoceluloses (Alg_CNC36 ; Alg_CNCT36 ; Alg_NFC36 ; Alg_NFCT36) apresentaram bandas características de estiramento O-H a $3600\text{-}3200\text{cm}^{-1}$ e em torno de 2900cm^{-1} de estiramento C-H. Bandas de absorção em 1594 e 1410cm^{-1} são características de alongamentos assimétricos e simétricos de grupos carboxilatos do polímero alginato (SMITHA *et al.*, 2005). A banda de deformação simétrica do grupo COO^- (1407cm^{-1}) para o polímero puro (alginato) exibiu um deslocamento para 1424cm^{-1} quando foram adicionados íons cálcio às soluções de alginato, sendo indício da reticulação iônica dos grupos carboxilatos presentes no sistema. Segundo Sartori *et al.* (1997) a substituição de íons sódio por cálcio pode alterar a densidade de carga, massa atômica e o raio ao redor dos grupos carboxila, causando o deslocamento. Além disso, a mudança em direção a um número de onda superior também pode ser

atribuída às interações intermoleculares entre os grupos -COO^- do alginato e as nanoceluloses para formar uma rede reticulada (PARK *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2012). Um aumento de intensidade em torno de $3600\text{-}3200\text{cm}^{-1}$ sugere ligações de hidrogênio entre o alginato e as nanoceluloses. As bandas entre 800 e 1200cm^{-1} estão relacionadas com a estrutura polissacarídica (vibração C-H, O-H, C-O e C-O-C no anel glicosídico).

Assim sendo, pelos deslocamentos de bandas características, pode-se confirmar as interações eletrostáticas entre os grupos -COO^- presentes no sistema e os íons Ca^{2+} , além das interações intermoleculares entre as próprias cadeias poliméricas (alginato/ nanoceluloses).

- ***Difração de Raio-X e cristalinidade dos géis de alginato***

A técnica de DRX foi utilizada para estudar propriedades estruturais dos géis de alginato e nanoceluloses. A partir dos resultados das análises de DRX, diversas características dos polímeros são avaliadas, dentre elas: a rigidez, a fluidez, a resistência à difusão de moléculas menores e a solubilidade. A Figura 5.13 apresenta o difratograma do gel de alginato reticulado com íons Ca^{2+} .

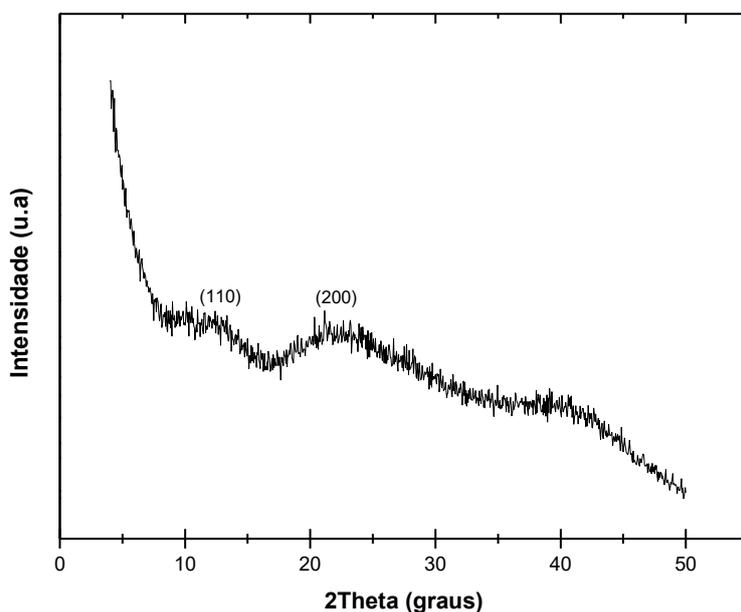


Figura 5.14: Difratograma do gel Alg_Ca^{2+} .

Pelo difratograma do alginato (Figura 5.14), foi possível perceber dois halos. Segundo Nery (2014), o alginato apresenta uma estrutura semi-cristalina com picos alargados correspondentes aos grupos gulurônicos e manurônicos. A intensidade máxima correspondente aos grupos gulurônicos ocorre no plano (110) e em $2\theta = 13,6^\circ$, já a intensidade máxima correspondente aos grupos manurônicos ocorre no plano (200) e em $2\theta = 21,8^\circ$. O alargamento da fase amorfa ocorre até, aproximadamente, $2\theta = 50^\circ$. A partir das interações eletrostáticas entre os íons Ca^{2+} e os grupos carboxilatos disponíveis na matriz de alginato (durante o processo de reticulação) há uma aproximação das cadeias poliméricas, podendo alterar o caráter cristalino do gel.

Sabendo que a cristalinidade dos géis de alginato é função das nanoceluloses adicionadas ao sistema, a Figura 5.15 apresenta o difratograma dos géis de alginato e nanoceluloses 36% (m/m), com os picos característicos das estruturas cristalinas de celulose.

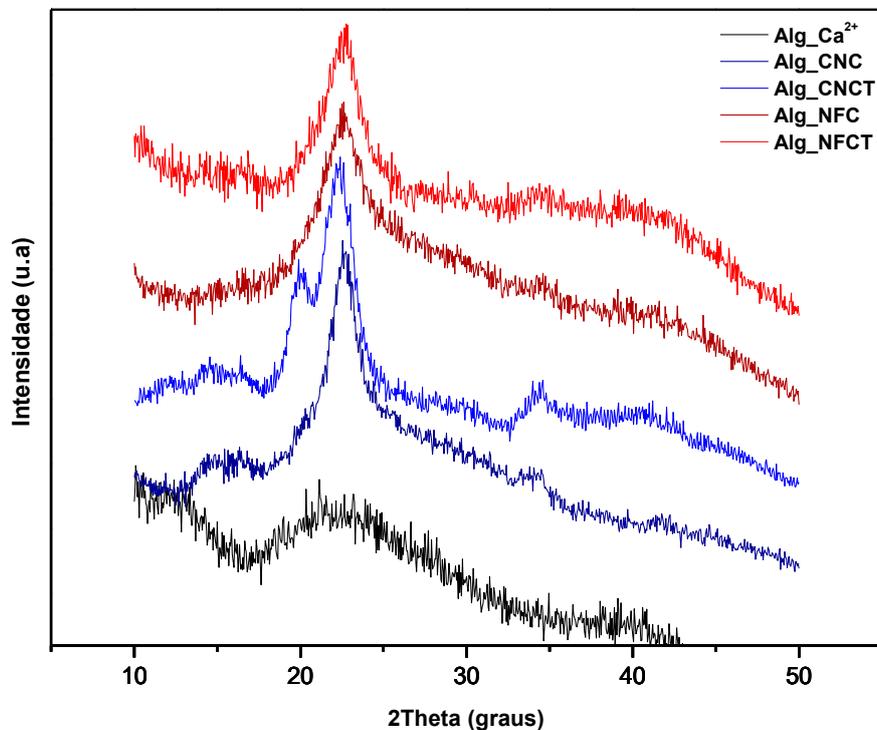


Figura 5.15: Difratograma dos géis de alginato e nanoceluloses (Alg_Ca²⁺; Alg_CNC36; Alg_CNCT36; Alg_NFC36; Alg_NFCT36).

A partir da análise da Figura 5.15, pode-se observar um aumento da cristalinidade do gel de alginato em função da adição das nanoceluloses aos sistemas. Picos característicos das estruturas cristalinas da celulose podem ser observados: pico de intensidade máxima em $2\theta = 22,5^\circ$, correspondente ao plano cristalográfico (200), em $2\theta = 15,3^\circ$, correspondente ao plano (110). Pode-se observar ainda um ombro localizado ao redor de $2\theta = 21^\circ$ mais pronunciado nas amostras de CNCT, que representa uma reflexão do plano (102/012) e um pico bem definido a $2\theta = 34,5^\circ$ referente ao plano (040). Como esperado, os géis Alg_CNC36 e Alg_CNCT36, onde foram adicionados 36% (m/m) de nanocristais de celulose ($I_c = 90\%$ e 82% , respectivamente) foram os que apresentaram os picos mais acentuados em $2\theta = 22,5^\circ$. Além disso, ressalta-se a possibilidade de uma contribuição dos nanocristais na ordenação das cadeias de alginato. Segundo Esteban *et al.* (2011) os CNCs podem ser modelos para a orientação das cadeias de alginato.

- **Análise termogravimétrica – TGA/ DTG**

Sabendo que, por meio do termograma, é também possível comparar diferentes comportamentos e visualizar efeitos de tratamentos, como reticulação, oxidação, dentre outros, análise de degradação térmica (TGA/ DTG, respectivamente) dos géis estudados (gel de alginato sem nanoceluloses - Alg_Ca²⁺ e gel de alginato e nanoceluloses - Alg_CNC36; Alg_CNCT36; Alg_NFC36; Alg_NFCT36) foram realizadas. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 5.16 e 5.17.

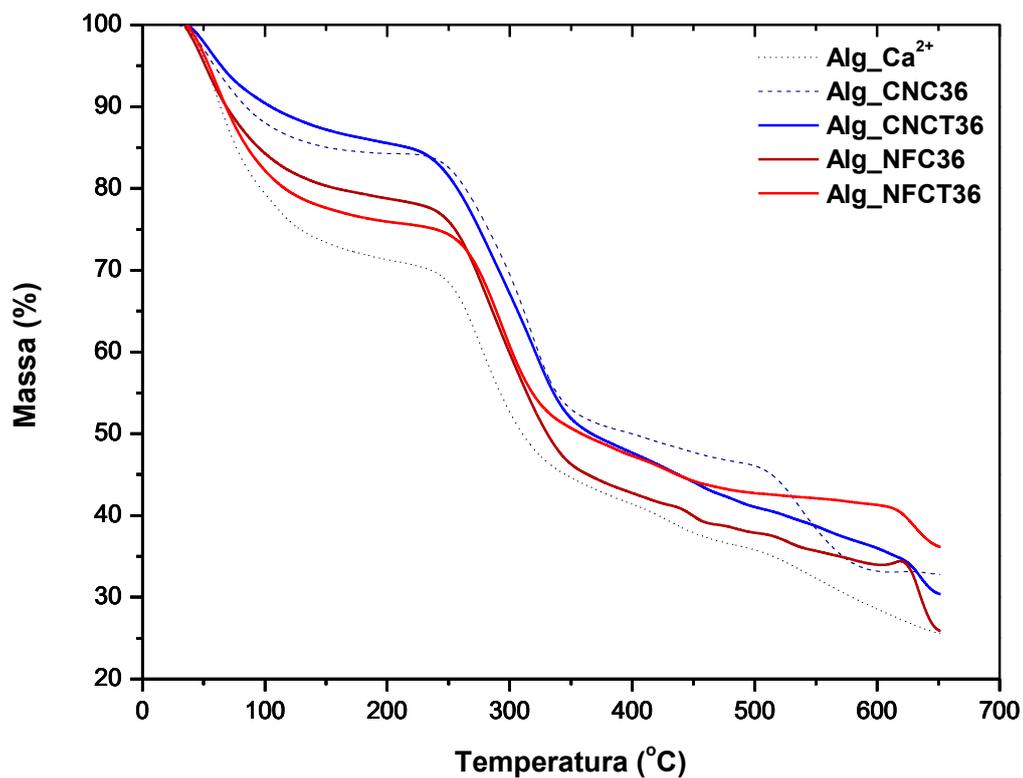
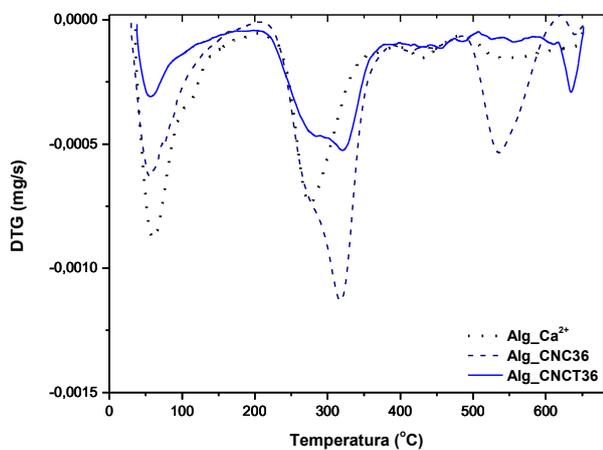
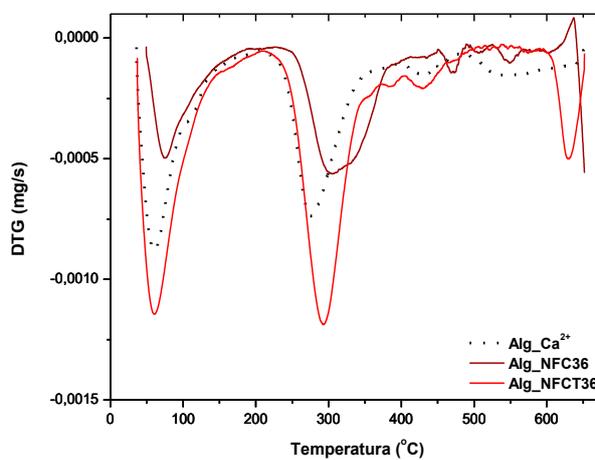


Figura 5.16: Curvas de TGA dos géis de alginato e alginato e nanoceluloses (36%), em atmosfera de N₂.



(a)



(b)

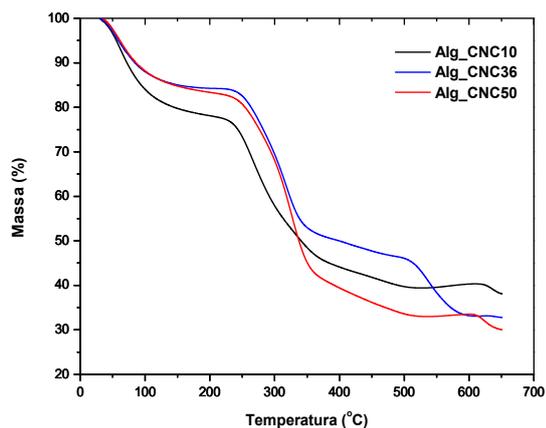
Figura 5.17: Curvas de DTG do gel de alginato puro e dos géis de alginato e nanoceluloses (36% m/m) – Alg_CNC36 e Alg_CNCT36 (a); Alg_NFC36 e Alg_NFCT36 (b).

A partir da análise das Figuras 5.16 e 5.17, pode-se observar três principais eventos de perda de massa para todas as amostras analisadas: o primeiro evento (de 20 a 200°C) corresponde à perda de água e a primeira decomposição dos oligossacarídeos (ABREU *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2009).

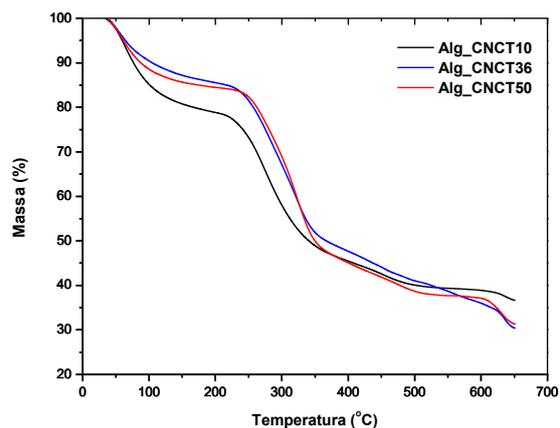
O segundo evento (entre 200 e 425°C) corresponde à degradação complexa dos glicosídeos presentes na estrutura do alginato e das nanoceluloses: despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas. Pode-se observar uma menor estabilidade térmica para o gel de alginato, sem adição de nanoceluloses (Alg_Ca²⁺). Neste evento, tem-se uma perda de massa de, aproximadamente, 55%, até uma temperatura de 350°C para o gel de alginato (Alg_Ca²⁺), 375°C e 400°C para o gel de alginato e nanofibra de celulose oxidada e sem modificação química, respectivamente (Alg_NFCT36; Alg_NFC36) e até 400°C e 425°C para o gel de alginato e nanocristal de celulose TEMPO-oxidado e sem oxidação, respectivamente (Alg_CNCT36; Alg_CNC36). Tal fenômeno confirma a participação das nanoceluloses na estabilidade térmica dos géis de alginato e a influência dos grupos carboxilatos na superfície das nanoceluloses (diminuição do ponto inicial de degradação térmica para os géis com as nanoceluloses oxidadas). Além destes fatores, as hemiceluloses presentes na estrutura das NFC também provocaram alterações nas temperaturas iniciais de degradação dos géis Alg_NFC36; Alg_NFCT36.

O terceiro evento ocorre devido à degradação de resíduos carbônicos para formação de produtos gasosos de baixa massa molar. No presente estudo, pode-se associar os resíduos do processo de degradação térmica (após 650°C) aos sais de cálcio, já que os íons Ca²⁺ foram utilizados como agentes de reticulação para os grupos -COO⁻ das cadeias de alginato e nanoceluloses TEMPO-oxidadas e também às interações eletrostáticas entre as cadeias de alginato, nanoceluloses e íons Ca²⁺; segundo Han *et al.* (2009), interações eletrostáticas resultam em produtos de maior estabilidade térmica, o que fica mais evidente, no presente estudo, para as amostras Alg_CNCT36 e Alg_NFCT36.

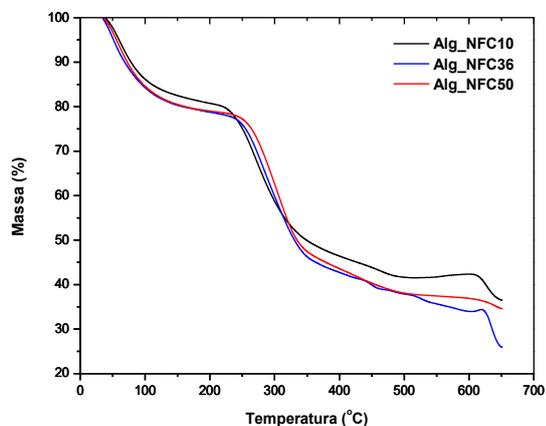
Avaliou-se também o efeito da concentração das nanoceluloses nos géis de alginato e os resultados estão apresentados na Figura 5.18.



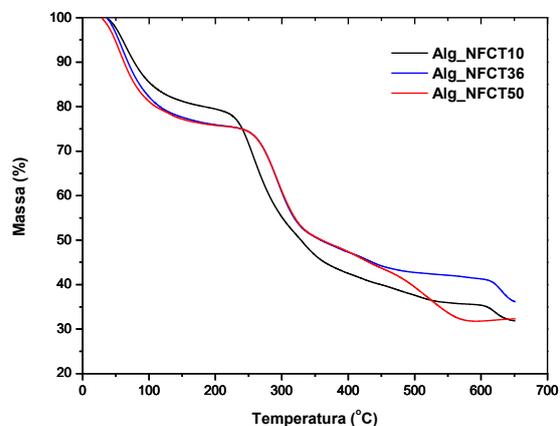
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 5.18: Curvas de TGA dos géis de alginato e nanoceluloses, em diferentes concentrações (10, 36 e 50% m/m), em atmosfera de N_2 – alginato e CNC (a); alginato e CNCT (b); alginato e NFC (c); alginato e NFCT (d).

Ao avaliar a influência da concentração das nanoceluloses na estabilidade térmica dos géis de alginato (Figura 18 a-d), pode-se observar, mais uma vez, que uma menor concentração de nanoceluloses (10% (m/m)) nos géis de alginato exerce pouca contribuição nas propriedades finais dos mesmos. Tal

fato é menos evidente para os géis contendo NFC em função da menor dispersão das nanoceluloses não modificadas, em todas as concentrações estudadas, na matriz de alginato. Novamente, a presença dos resíduos após 650°C pode estar associada aos compostos contendo cálcio, uma vez que os íons Ca^{2+} foram utilizados como agentes de reticulação para os grupos $-\text{COO}^-$, e às interações eletrostáticas entre as cadeias de alginato e as nanoceluloses TEMPO-oxidadas com íons os Ca^{2+} (HAN *et al.*, 2009).

5.2.2 Propriedades morfológicas dos géis de alginato e nanoceluloses

- *Microscopia eletrônica de varredura – MEV e microtomografia de raios-X (micro-CT)*

O tamanho dos poros do gel, a distribuição e interconexão entre eles são também de grande importância na absorção de líquidos (ZHANG *et al.*, 2015) e, conseqüentemente, na viabilidade celular, uma vez que influenciam no transporte de nutrientes e outros fluidos biológicos. Para demonstrar a influência da adição dos diferentes tipos de nanoceluloses nas propriedades morfológicas dos géis de alginato, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 5.19) e de microtomografia de raios-X (micro-CT) (Figuras 5.20 e 5.21).

A Figura 5.19 apresenta imagens da seção transversal de amostras dos géis de alginato e alginato/nanoceluloses (50% m/m) obtidas por MEV. É possível perceber que o material possui uma estrutura interna esponjosa, com poros largos e paredes bem finas e definidas, característico de géis de alginato de cálcio.

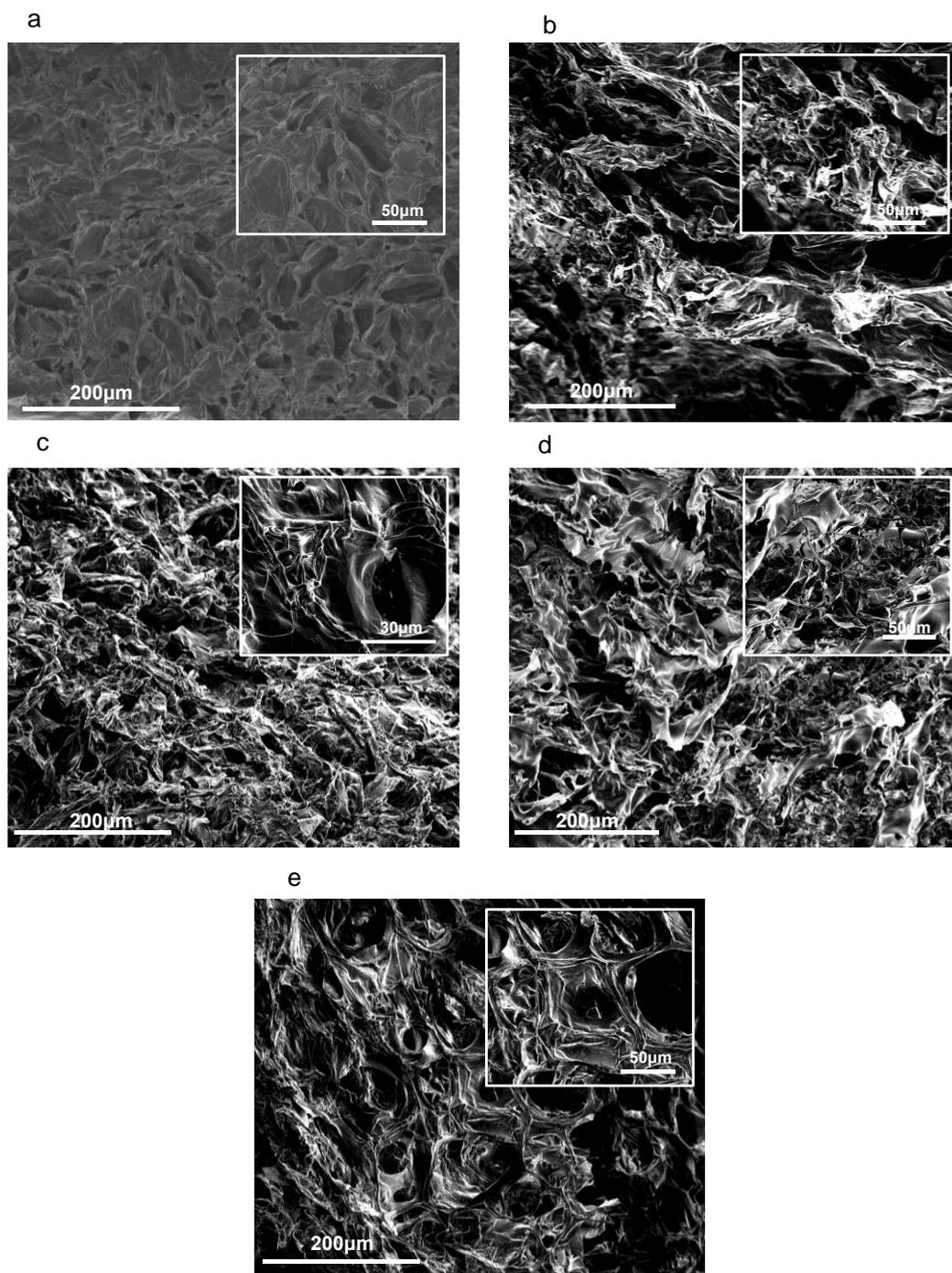


Figura 5.19: Caracterização morfológica do gel de alginato puro (Alg_Ca^{2+}) (a) e géis de alginato e nanoceluloses (50% m/m) - Alg_CNC50 (b); Alg_CNCT50 (c); Alg_NFC50 (d); Alg_NFCT50 (e) com magnificação de 500 x. As inserções representam uma magnificação de 1500 x (a, b, d, e) e 3500 x (c).

A partir da análise das micrografias MEV da seção transversal dos géis de alginato, criofraturados com nitrogênio líquido (Figura 5.19) pode-se observar uma morfologia típica de materiais liofilizados (SEHAQUI *et al.*, 2011): estruturas altamente porosas com paredes muito finas e bem definidas. A adição de nanoceluloses (CNC, CNCT, NFC ou NFCT) contribuiu para a formação de estruturas com poros de maior diâmetro, variando de 40 a 150 μm , (Figura 5.19 b-e) quando comparados ao gel de alginato sem adição de nanoceluloses que apresentaram tamanhos de poros na ordem de 20 a 40 μm (Figura 5.19 a). Segundo Wake *et al.* (1994) e Li *et al.* (2005), estruturas porosas (com diâmetro de poros entre 100 e 300 μm) favorecem o crescimento celular e estes resultados são interessantes para as futuras aplicações biomédicas dos géis.

Para melhor avaliar a morfologia dos géis de alginato e nanoceluloses, amostras contendo CNCT e NFCT (50% m/m) foram avaliadas por microtomografia de raios-X (micro-CT). A grande vantagem desta técnica é a obtenção de informações qualitativas e quantitativas tridimensionais do volume, tamanho, forma, distribuição e conectividade das estruturas internas do material (LOPES *et al.*, 2010). A visualização 3D auxilia no entendimento da morfologia das amostras uma vez que nela tem-se a noção espacial de como as conexões internas estão dispostas e interligadas (LIMA *et al.*, 2007). As Figuras 5.20 e 5.21 apresentam imagens obtidas por micro-CT para os géis Alg_CNCT50 e Alg_NFCT50, respectivamente. Ressalta-se que, apesar das limitações desta técnica de análise (pois, a resolução espacial das imagens de micro-CT é de, aproximadamente, 10 pixels) as informações obtidas para porosidade total a partir das imagens de micro-CT foram consideradas as mais apropriadas para o material em estudo em função das suas características físicas e químicas. Além disso, deve-se considerar também o fato de que, no presente trabalho, a técnica foi utilizada com o objetivo de se fazer um comparativo entre amostras de géis com diferentes tipos de nanoceluloses.

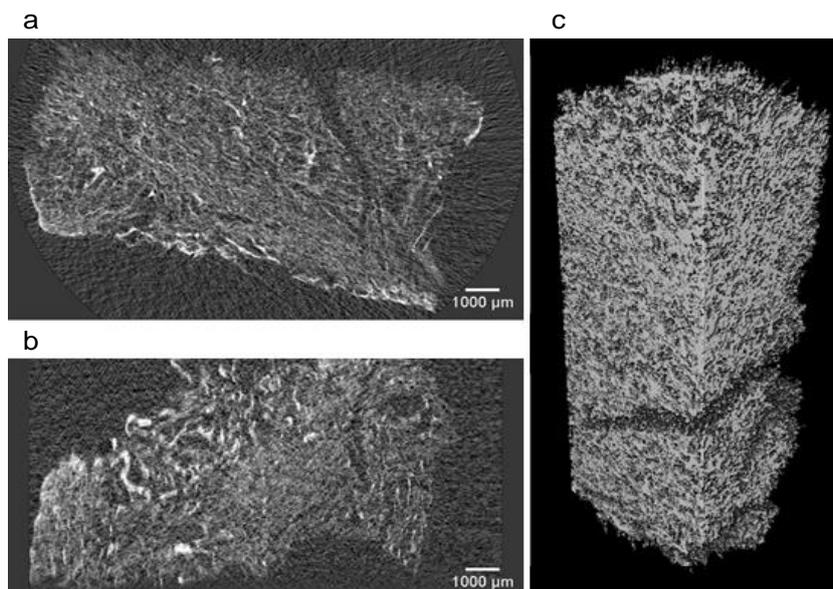


Figura 5.20: Imagens de microtomografia de raios-X do gel de alginato e CNCT 50% (m/m) - Seções transversais da amostra (a - b); volume da amostra exibindo arranjo de sua parede em 3D (c).

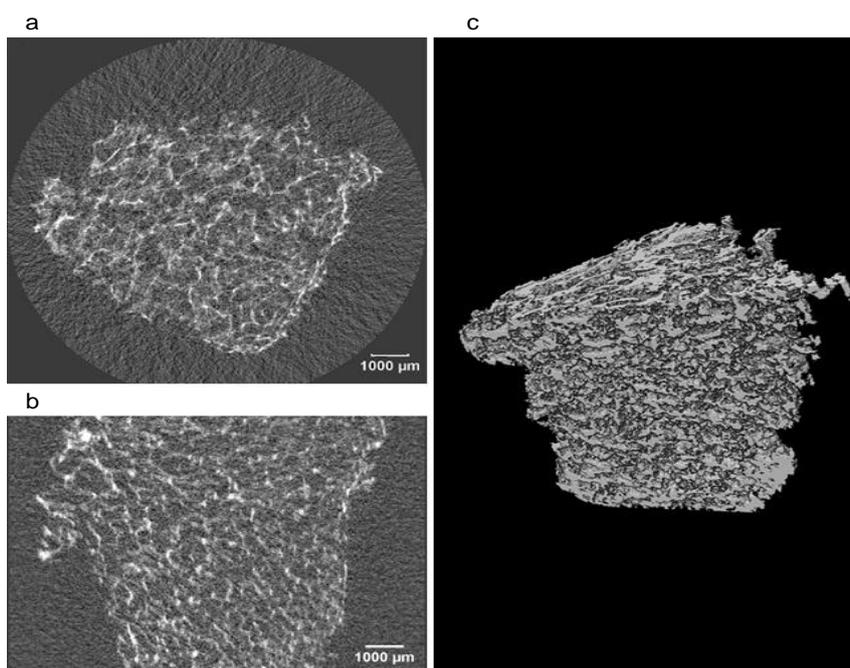


Figura 5.21: Imagens de microtomografia de raios-X do gel de alginato e NFCT 50% (m/m) - seções transversais da amostra (a - b); volume da amostra exibindo arranjo de sua parede em 3D (c).

A partir da análise da Figura 5.20 pode-se observar uma ampla distribuição do tamanho dos poros e também uma estrutura de poros orientados para o gel de alginato e CNCT (Alg_CNCT50). Além disso, pode-se visualizar trincas ao longo do volume do gel, resultado das características físicas (rigidez) dos géis de alginato contendo nanocristais de celulose, preparados neste estudo. Para o gel de alginato e NFCT (Figura 5.21), uma organização da parede porosa bastante diferente pode ser observada: confirma-se que o gel Alg_NFCT50 apresenta poros maiores e com uma distribuição mais uniforme quando comparado ao gel Alg_CNCT50.

Para avaliar quantitativamente a porosidade dos géis de alginato e NFCT/ CNCT e a distribuição da espessura da parede dos poros utilizou-se técnicas de processamento de imagem (Image J), semelhante ao descrito por Isaac *et al.* (2015) e os resultados estão apresentados na Figura 5.22. Valores de porosidade igual a 50% e 80% foram encontrados para os géis de alginato e nanoceluloses (50% m/m) - gel Alg_CNCT50 e gel Alg_NFCT50, respectivamente. Segundo Zhang *et al.* (2015) géis de alginato liofilizados possuem uma estrutura altamente porosa e esta porosidade está fortemente correlacionada com o desempenho mecânico do material. Além disso, as amostras do gel Alg_CNCT50 apresentaram paredes mais espessas, entre 16 e 20 μm , encontradas, principalmente, em algumas regiões do gel (Figura 5.22a). Amostras do gel Alg_NFCT50 exibiram uma distribuição mais uniforme também das paredes espessas, conforme apresentado na Figura 5.22b).

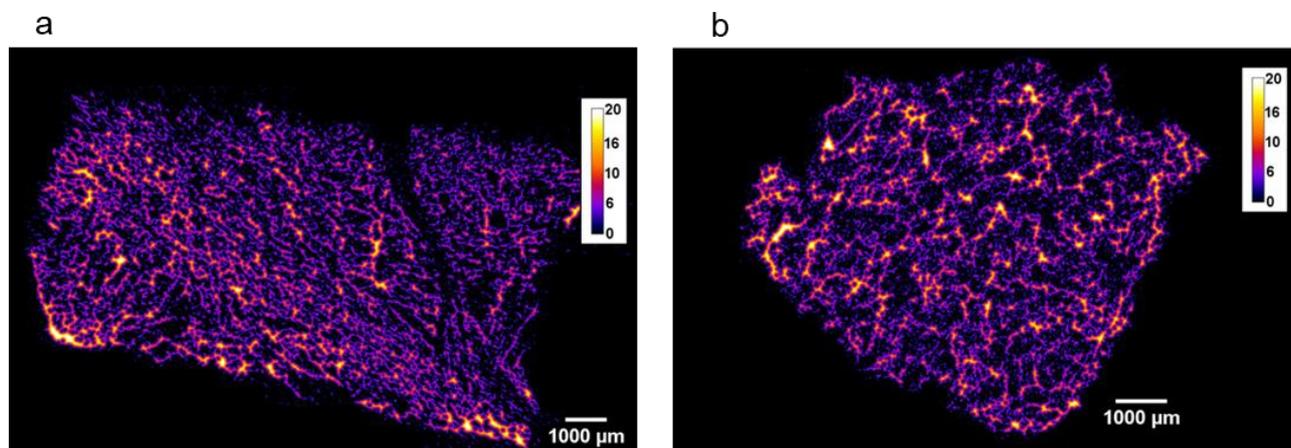


Figura 5.22: Mapas da espessura das paredes dos poros dos géis de alginato e CNCT 50% (m/m) (a); e alginato e NFCT 50% (m/m) (b). A legenda e a barra de escala estão em microns.

- **Grau de inchamento**

O grau de inchamento dos géis é uma propriedade importante, pois muitas das suas aplicações dependem da sua capacidade de absorver água (ZHANG *et al.*, 2015). A fim de se conhecer propriedades físico-químicas do gel de alginato e nanoceluloses, realizou-se, primeiramente, a cinética de inchamento para o gel de alginato reticulado com cálcio (Alg_Ca²⁺), em água milli-Q (pH 6,2) e em PBS (pH 7,4), a 25 e 37°C (Figura 5.23).

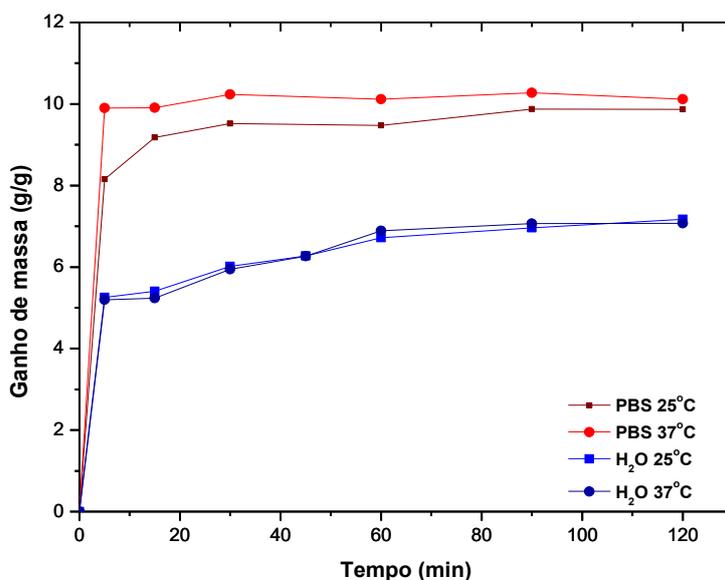


Figura 5.23: Ganho de massa do gel de alginato (Alg_Ca²⁺) em função do tempo, a 25°C e 37°C, em H₂O milli-Q (pH 6,2) e em PBS pH 7,4.

A partir da análise da Figura 5.23, determinou-se o tempo de equilíbrio para os géis estudados. Em água milli-Q foram necessários, aproximadamente, 60 minutos para se obter um ganho de massa máximo e constante (7g/g). Em PBS, pH 7,4, após 30 minutos o equilíbrio químico foi alcançado, com um ganho de massa máximo de aproximadamente 10g/g, a 25°C e 37°C. Esta pequena variação no grau de inchamento do gel de alginato em função da temperatura, em PBS, pode ser justificada pela presença de grupos hidrofílicos que, em maiores temperaturas, têm as interações polímero-água favorecidas (QUEIROZ, 2010).

Além disso, sabe-se que o processo de inchamento depende da composição química dos polímeros que formam o hidrogel, do pH e da força iônica do meio em que ele está inserido. Quando o gel se hidrata, as cadeias poliméricas interagem com as moléculas do solvente e se expandem; enquanto isso, a área reticulada oferece uma força de retração para conter a expansão dos polímeros. O movimento de retração e expansão ocorre até que se atinja o equilíbrio em uma dada temperatura (BAJPAI e ANJALI, 2003; BHATTARAI *et al.*, 2010).

Hidrogéis de alginato reticulados ionicamente não são estáveis em meio fisiológico (BREGGER *et al.*, 2015). Desintegram rapidamente na presença de quelantes de cálcio (por exemplo, fosfatos) ou íons monovalentes, como Na⁺ ou K⁺ (ZHANG *et al.*, 2015). Tal fato pode justificar uma maior e mais rápida expansão das cadeias poliméricas do gel de alginato em PBS, pH 7,4 (tempo de equilíbrio de 30 minutos e ganho de massa máximo de 10g/g), se comparado ao equilíbrio em água milli-Q (60 minutos e ganho de massa máximo de 7g/g).

Para os demais géis de alginato (alginato e nanoceluloses), visando obter o inchamento máximo e entender o comportamento do material em condições fisiológicas para futuras aplicações biomédicas, realizou-se os demais testes de inchamento em H₂O milli-Q e em PBS, pH 7,4, a 37°C, em um tempo de 2 horas (tempo superior ao de equilíbrio químico). Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela V.4.

Tabela V.4: Ganho de massa máximo após ensaio de inchamento (2h; 37°C em água milli-Q e em PBS, pH 7,4) para os géis de alginato e nanoceluloses.

AMOSTRA	Ganho de massa (g/g) Água milli-Q; pH6,2	Ganho de massa (g/g) PBS; pH7,4
Alg_Ca ²⁺	6,64 ± 0,05	10,75 ± 0,62
Alg_CNC10	5,86 ± 0,20	9,16 ± 0,91
Alg_CNC36	8,33 ± 0,05	8,52 ± 0,59
Alg_CNC50	7,47 ± 0,46	8,89 ± 1,95
Alg_CNCT10	7,57 ± 0,77	7,35 ± 0,68
Alg_CNCT36	8,44 ± 0,45	9,01 ± 1,28
Alg_CNCT50	8,24 ± 0,51	11,45 ± 0,50
Alg_NFC10	6,86 ± 0,13	11,45 ± 0,42
Alg_NFC36	9,78 ± 0,10	11,50 ± 0,56
Alg_NFC50	11,36 ± 0,61	13,19 ± 2,00
Alg_NFCT10	16,31 ± 0,58	17,34 ± 0,85
Alg_NFCT36	17,73 ± 0,78	17,72 ± 0,86
Alg_NFCT50	14,61 ± 0,06	18,13 ± 0,56

Pode-se observar que as nanofibras de celulose são capazes de alterar, de maneira mais significativa, as propriedades estruturais dos géis de alginato (quando se compara com os géis de alginato preparados com conteúdos similares de nanocristais), permitindo, assim, uma maior absorção de umidade. Tal fato pode ser associado à maior razão de aspecto das nanofibras (evidenciado por MET) que permite um entrelaçamento entre as cadeias de alginato e influencia mais efetivamente na construção estrutural dos géis. Além disso, a presença de grupos carboxilatos na superfície das NFCT permite que estas participem também do processo de reticulação dos géis. Assim, as NFCT formam uma rede polimérica semi-interpenetrante (semi-IPN) com os géis de alginato (fato também reportado

por Lin *et al.*, 2012). Como resultado, pode-se observar um aumento de até 20 vezes, aproximadamente, no valor da massa inicial dos géis de alginato, ao se adicionar as NFC e NFCT ao sistema. A adição de CNC e CNCT aos géis de alginato não influenciou no grau de inchamento quando comparados àquele sem adição de nanocelulose (Alg_Ca²⁺). Wen *et al.* (2015) afirmam que as nanofibras participantes da síntese de géis compósitos podem funcionar como um "suporte" da rede de polímeros, abrindo as estruturas e melhorando a capacidade de inchamento do material resultante. No presente estudo, a adição de NFC ou NFCT resultou em um aumento da área específica da superfície e do tamanho dos poros dos géis (como apresentado pelas imagens de MEV e micro-CT), contribuindo diretamente para o aumento do grau de inchamento.

Sabe-se que o inchamento dos géis é resultado da difusão de moléculas de solvente para o interior dos mesmos e sua acomodação na estrutura polimérica. Essa retenção de moléculas ocorre, inicialmente, nos espaços vazios. Porém, o inchamento envolve, inevitavelmente, uma mudança no arranjo espacial das cadeias poliméricas resultando em um aumento de volume da amostra (LUCAS *et al.*, 2001). A partir de 2 horas de contato dos géis de alginato com solução tampão de fosfato (pH 7,4), a 37°C, algumas amostras começaram a se desintegrar: gel de alginato sem nanoceluloses (Alg_Ca²⁺) e amostras dos géis contendo CNC e CNCT (10, 36 ou 50% m/m). As amostras dos géis contendo NFC e NFCT (10, 36 ou 50% m/m) apresentaram maior resistência à solubilização em PBS e, somente após 22 horas de contato, pode-se identificar perdas de massa do material.

A estabilidade do gel é importante porque está diretamente relacionada com o seu desempenho. Estudos envolvendo diferentes etapas de reticulação com íons Ca²⁺ (SILVA, 2009), concentração da solução reticuladora (SARTORI *et al.*, 1997) ou formação de IPN com as cadeias de alginato (ZHANG *et al.*, 2015) foram realizados visando minimizar a cinética de desintegração dos géis em condições fisiológicas. Pavlath *et al.* (1999) em seus trabalhos com filmes de alginato reticulados com diferentes cátions multivalentes, num processo de imersão, constataram que a reticulação e, conseqüentemente, a massa solubilizada em água era função tanto do tempo como da concentração da solução reticuladora. Propuseram dois processos competitivos: a rápida dissolução do alginato de sódio e a difusão lenta dos cátions multivalentes que reticulam a superfície do material, reduzindo a taxa de dissolução.

No presente estudo, observou-se que a adição das NFC/ NFCT aumentou a porosidade dos géis de alginato e a estabilidade dos mesmos em condições fisiológicas (PBS pH 7,4, a 37°C). Acredita-se que nos géis de alginato e NFC/ NFCT, por apresentarem maior número de poros, interconectados, a difusão dos íons Ca^{2+} foi facilitada, aumentando-se a reticulação no interior dos géis. Consequentemente, uma menor perda de massa foi observada durante os ensaios de inchamento, potencializando a aplicações destes materiais na área biomédica.

A partir dos resultados obtidos para os ensaios de inchamento e análise de porosidade pode-se também afirmar que a variação no volume final de água durante a síntese das amostras contendo nanoceluloses (variação máxima de 22%) não influenciou nas propriedades finais das mesmas, a citar: Alg_CNC10 (16,8mL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{total}}$) com um ganho de massa de, aproximadamente, 10g/g, após 2h em PBS; Alg_CNC50 (21,78mL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{total}}$) com um ganho de massa de 7,5g/g, após 2h em PBS.

- ***Análise Termodinâmico-Mecânica (Dynamic Mechanical Thermal Analyses - DMTA)***

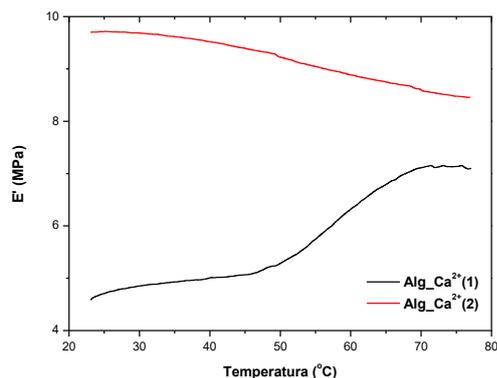
As propriedades mecânicas dos géis são de grande importância para as suas aplicações finais. Para seu uso como implantes, são necessários módulos E variando de 0,1 a 1,0MPa, resistência à tração de 1 a 10MPa e resistência à compressão entre 20 e 60MPa, pois são comparáveis a alguns tecidos humanos naturais, como tendões e derme (MATRICARDI *et al.*, 2013).

A análise termodinâmico-mecânica permite correlacionar as propriedades macroscópicas, devido às solicitações mecânicas, às relaxações moleculares associadas a mudanças conformacionais e às deformações microscópicas geradas a partir de rearranjos moleculares em função da variação da temperatura (WUNDERLICH *et al.*, 1997). Para materiais poliméricos, as suas propriedades termodinâmico-mecânicas são determinadas por sua viscoelasticidade que depende do tipo de ensaio e da solicitação mecânica aplicada. Nesses materiais as contribuições elástica e viscosa para o módulo de elasticidade e de perda, respectivamente, podem ser separadas e estudadas individualmente em função de variações nos valores de temperatura (CASSU, 2005).

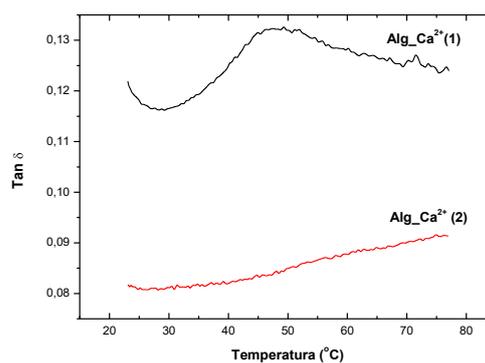
Para correlacionar as propriedades macroscópicas dos géis de alginato e géis de alginato e nanoceluloses desenvolvidos no presente estudo, com relaxamento molecular termicamente induzido e interações físico-químicas, foram realizadas análises termodinâmico-mecânicas (DMTA). A Figura 5.24 apresenta a variação do módulo de armazenamento (E') em função do aumento da temperatura e os valores de $\text{Tan } \delta$ (relação entre as variações nos módulos de perda e armazenamento) para o gel de alginato (Alg_Ca^{2+}) durante o primeiro e segundo ciclos de aquecimento.

Pode-se observar um aumento de aproximadamente 94% do E' na temperatura de 37°C quando se comparam o primeiro e o segundo ciclos de aquecimento. Para temperaturas mais elevadas, por exemplo, a 70°C, essa diferença diminui para aproximadamente 25% quando são comparados os dois ciclos. Tal comportamento pode ser explicado por dois fenômenos concomitantes: o primeiro é a redução do efeito plastificante da água em função do aumento da temperatura e, conseqüentemente, sua eliminação gradual. Nesse caso, as cadeias poliméricas sofrem relaxações e se aproximam, aumentando a organização microestrutural e o emaranhamento entre cadeia-cadeia. O segundo é o aumento no grau de reticulação iônica provocado pelo aumento de mobilidade e aproximação cadeia-cadeia.

Tais assertivas são corroboradas pelo desaparecimento da $\text{Tan } \delta$ em função do aumento da temperatura no segundo ciclo de aquecimento e dentro da faixa utilizada nesse estudo (entre 30 e 80°C).



(a)



(b)

Figura 5.24: Módulo de armazenamento do gel de alginato (Alg_Ca^{2+}) em dois ciclos de aquecimento (a); valores de $\text{Tan } \delta$ em função da temperatura (ciclos 1 e 2) (b).

Segundo Hutchinson *et al.* (1997), a relaxação das cadeias que ocorre na região de transição vítrea é resultante dos movimentos moleculares a longas distâncias, que envolvem os segmentos da cadeia polimérica principal. Hutchinson *et al.* (1997) também afirma que na região de transição vítrea, o comportamento mecânico de polímeros amorfos varia de um comportamento típico de material rígido para o de um material elastomérico. A faixa de temperatura na qual este processo ocorre depende de vários fatores, tais como a composição, a flexibilidade das cadeias, a massa molar do polímero, a presença de plastificantes, o grau de reticulação e de cristalinidade.

Para compreender a influência da concentração das nanoceluloses nas propriedades mecânicas dos géis de alginato, foram preparados materiais com duas concentrações diferentes de nanoceluloses (36% m/m e 50% m/m) e avaliou-se as propriedades termodinâmico-mecânicas em dois ciclos de aquecimento. Denominou-se o E'_1 o módulo de armazenamento das amostras após o primeiro ciclo de aquecimento e E'_2 , o módulo de armazenamento após o segundo ciclo de aquecimento, obtidos em faixas de temperatura específicas (de 35 a 42°C), visando aplicações biomédicas. Os resultados estão indicados na Tabela V.5. Ressalta-se que, para os géis contendo nanoceluloses na concentração

de 10% (m/m), ensaios mecânicos não foram realizados em função da heterogeneidade das amostras e instabilidade dimensional das mesmas (já apresentadas ao longo deste trabalho).

Tabela V.5: Módulo de armazenamento ($E'1$ e $E'2$) dos géis Alg_NFC, Alg_NFCT, Alg_CNC e Alg_CNCT, com diferentes concentrações das nanoceluloses (36 e 50% m/m), na faixa de temperatura corporal (35, 37 e 42°C).

GEL	35°C		37°C		42°C	
	$E'1$ (MPa)	$E'2$ (MPa)	$E'1$ (MPa)	$E'2$ (MPa)	$E'1$ (MPa)	$E'2$ (MPa)
Alg_CNC36	2,27	2,12	2,67	2,63	3,00	3,02
Alg_CNC50	0,10	0,12	0,10	0,11	0,10	0,12
Alg_CNCT36	4,49	4,48	5,25	5,24	7,83	7,81
Alg_CNCT50	0,97	0,96	1,14	1,12	1,22	1,21
Alg_NFC36	0,15	2,13	0,16	2,10	0,47	2,29
Alg_NFC50	0,02	0,23	0,02	0,24	0,02	0,22
Alg_NFCT36	1,13	2,52	1,30	2,55	1,66	2,66
Alg_NFCT50	0,33	3,46	0,40	3,54	0,62	3,74

Pela análise da Tabela V.5 pode-se observar que os géis de alginato e CNC / CNCT não apresentaram variações significativas de E' no segundo ciclo de aquecimento, o que pode ser justificado pela menor mobilidade das cadeias e uma reticulação adicional, termicamente induzida, “completa” e/ ou dificultada. Além disso, um aumento na proporção em massa de CNC ou CNCT nos géis de alginato provoca uma redução no módulo de armazenamento dos géis, na faixa de temperatura analisada. Tal fato pode ser explicado pela formação de fases e/ ou aumento do tamanho dos poros em função da maior concentração das nanopartículas nos géis. As interações laterais entre CNC-CNC e CNCT-CNCT, com o aumento da proporção em massa das nanopartículas, dificulta a dispersão das mesmas

na estrutura do material e contribui para a formação de fases, reduzindo o E' dentro da faixa de temperatura utilizada nesse estudo. Os valores inferiores de E' para os géis Alg_CNC quando comparados aos géis de Alg_CNCT podem ser justificados pela possível interferência dos CNC na matriz de alginato e cálcio. Segundo Esteban *et al.* (2011) o desempenho mecânico de um material de alginato de cálcio depende, principalmente, do tipo e da força nas “zonas de junção”. A adição de CNC pode interromper a estrutura "egg box" do material, ocasionando prejuízos às propriedades mecânicas dos mesmos.

Os géis preparados com NFC apresentaram uma redução do E' com o aumento da concentração em massa de nanoceluloses (assim como os CNC/ CNCT). Entretanto, os géis preparados com NFCT apresentam um comportamento inverso, ou seja, um aumento do E' com o aumento da concentração das mesmas, após o segundo ciclo de aquecimento. Tal fato pode ser justificado pelo aumento de grupos carboxílicos nas nanofibras, após oxidação TEMPO que permitem uma melhor interação entre o alginato e as NFCT através de reticulação iônica com íons Ca^{2+} , termicamente induzida; como consequência, tem-se melhorias nas propriedades mecânicas.

Assim sendo, acredita-se que as NFCT participem mais ativamente da microestrutura dos géis de alginato e nanoceluloses através da formação de géis semi-IPNs, o que afeta diretamente os valores de E'. Ressalta-se, portanto, que os géis de alginato e nanocristais de celulose (Alg_CNC e Alg_CNCT) apresentaram-se mais rígidos e com melhores propriedades mecânicas (mais especificamente E') se comparados aos demais géis de alginato e nanofibras. De France *et al.* (2017) reportaram em seus trabalhos de revisão que a incorporação física de CNC em hidrogéis de alginato aumentam o módulo compressivo do gel e a estabilidade contra a degradação, tendo pouco efeito sobre a viabilidade celular (WANG *et al.*, 2016).

Com o objetivo de obter melhorias nas propriedades mecânicas dos géis de alginato e NFCT e corroborando com os resultados obtidos a partir das análises de DMTA (Tabela V.5), foi feito um pós-tratamento térmico, em estufa, a 80°C, para os géis Alg_NFCT50 – Figura 5.25.

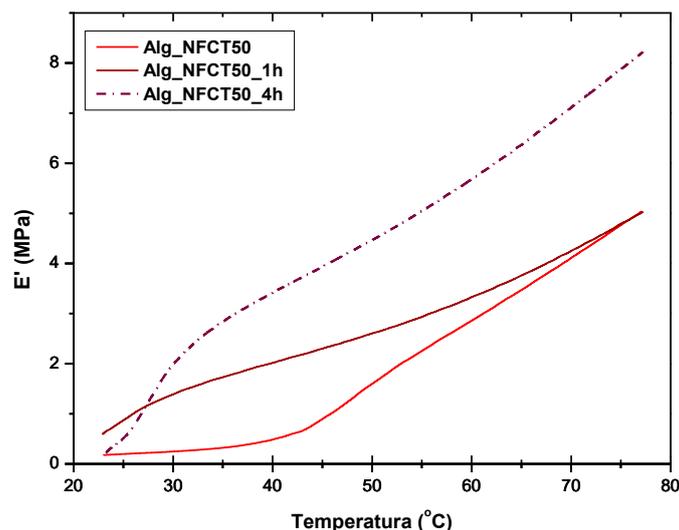


Figura 5.25: Módulo de armazenamento do gel de alginato e NFCT 50% (m/m) (Alg_NFCT50) sem tratamento térmico e após tratamento térmico, a 80°C.

Pela análise da Figura 5.25 um aumento considerável no valor de E' (para todas as faixas de temperatura estudadas) pode ser observado quando foram utilizados tempos mais longos de pós-tratamento térmico. Tal fato corrobora para a possibilidade de uma reticulação iônica adicional, termicamente induzida, entre os íons Ca^{2+} e os grupos carboxílicos disponíveis na estrutura. Os géis Alg_NFCT50, principalmente em função dos grupos carboxílicos presentes na superfície das NFCT e da flexibilidade de suas cadeias, apresentaram propriedades mecânicas melhoradas, promissoras para possíveis aplicações biomédicas, após períodos relativamente curtos de um tratamento térmico (4horas) resultantes de uma reticulação adicional do material.

- ***Ensaio de Citotoxicidade e Crescimento Celular***

Os hidrogéis são muito utilizados para cultura celular e revelam fenômenos fundamentais que regulam o comportamento das células, diferentemente dos substratos convencionais (CALIARI, 2016). Para demonstrar o potencial dos géis de alginato e nanocelulose, sintetizados no presente estudo, como materiais biocompatíveis, amostras dos géis contendo 50% (m/m) de nanocristais ou nanofibras de celulose TEMPO-oxidadas (Alg_CNCT50 e Alg_NFCT50), tratadas termicamente (a

80°C, por 4h) foram selecionadas para os testes de citocompatibilidade. A escolha de tais amostras foi baseada nas propriedades físico-químicas, mecânicas e morfológicas avaliadas ao longo deste trabalho e, para efeitos comparativos, os mesmos ensaios foram realizados com o gel de alginato sem nanoceluloses (Alg_Ca²⁺).

A citotoxicidade dos géis de alginato e nanoceluloses foi avaliada pelo teste MTT, tanto no método do contato direto das células de fibroblastos L929 com os géis Alg_Ca²⁺, Alg_CNCT50 e Alg_CNFT50, quanto pelo método indireto (ou método do eluato), onde o extrato dos géis foi exposto a uma camada de células e incubado por 24, 48, 72 e 96 horas. O MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é um sal amarelo que sofre processo de redução, pela atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, resultando em um sal de formazan, de cor púrpura. Neste teste avalia-se, portanto, a atividade mitocondrial, onde somente células metabolicamente ativas conseguem converter o sal amarelo MTT em cristais de formazan. Os fibroblastos, células do tecido conjuntivo, escolhidas para este estudo, originam-se a partir de uma célula mesenquimal indiferenciada e estão embebidos em uma matriz extracelular secretada por eles. Estas células são fundamentais para a deposição, remodelação e organização da matriz extracelular, especialmente durante o processo de cicatrização de feridas (HINZ *et al.*, 2007). Ressalta-se que para a avaliação dos testes de biocompatibilidade, incluindo citotoxicidade *in vitro*, adotou-se os seguintes critérios, segundo ISO10993-5 (2009), medidos com base na viabilidade celular do controle:

- Amostra não citotóxica: viabilidade celular > 90%;
- Amostra levemente citotóxica: viabilidade celular entre 60 e 90%;
- Amostra moderadamente citotóxica: viabilidade celular de 30 a 59%;
- Amostra severamente citotóxica: viabilidade celular ≤ 30%.

A Figura 5.26 apresenta os resultados da viabilidade celular (pelo teste MTT) obtidos após 24, 48, 72 e 96 horas, em contato direto e indireto das células de fibroblastos L929 com os géis Alg_Ca²⁺, Alg_CNCT50 e Alg_CNFT50.

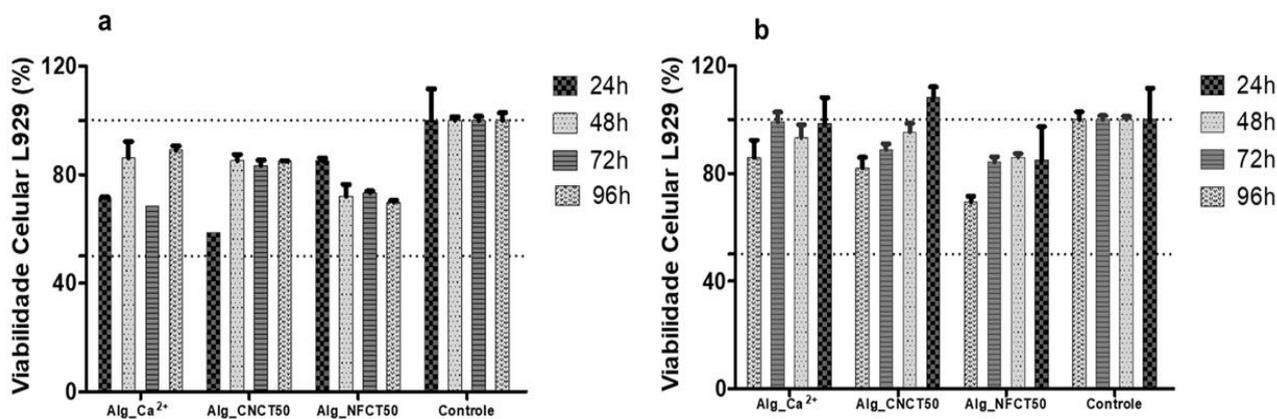


Figura 5.26: Ensaio MTT de fibroblastos L929 semeados no gel de alginato puro (Alg_Ca²⁺) e nos géis de alginato e nanoceluloses (50% m/m) (Alg_CNCT50 e Alg_NFCT50). Ensaio de contato direto - citotoxicidade e proliferação celular avaliadas após 24, 48, 72 e 96 horas (a); ensaio de contato indireto (eluato por 48h) citotoxicidade e proliferação celular avaliadas após 24, 48, 72 e 96 horas (b). Os dados representam a média \pm desvio padrão de seis repetições para cada material (n = 6).

Os resultados obtidos a partir do ensaio de citotoxicidade pelo contato direto das células de fibroblastos L929 nos géis Alg_Ca²⁺, Alg_CNCT50 e Alg_CNFT50 (Figura 5.26a) indicaram um efeito levemente citotóxico das amostras (com viabilidade celular na faixa de 60-85%), com um melhor perfil de citocompatibilidade apresentado pelos géis Alg_CNCT50 e Alg_NFCT50. Ao mesmo tempo, pode-se observar que o crescimento celular nos géis Alg_CNCT50 e Alg_NFCT50 permaneceu estável, no intervalo de tempo analisado, e que a população de células é maior nos géis contendo nanoceluloses (50% m/m), especialmente no gel Alg_CNCT50, quando comparados ao gel de alginato puro (Alg_Ca²⁺), após 2 e 4 dias de cultura. Segundo Naseri *et al.* (2016) e Domingues *et al.* (2014) a adição de CNCT e NFCT pode promover a fixação, disseminação e crescimento celular nos géis de alginato. Pariente *et al.* (2002) afirmam que a exposição direta das células aos biomateriais simula condições *in vivo* de interações diretas das células transplantadas ou hospedeiras com os biomateriais implantados e permite a avaliação destas interações célula-biomaterial.

É importante ressaltar também a menor viabilidade das células de fibroblastos L929 nas amostras dos géis Alg_Ca²⁺ e Alg_CNCT50, analisadas após 24h de contato direto: este comportamento pode

ser atribuído à menor estabilidade dos géis Alg_Ca²⁺ e Alg_CNCT50 no meio de cultura, com alto grau de inchamento e início da sua desintegração. Consequentemente, houve uma diminuição da viabilidade e crescimento celular (KIRDPONPATTARA *et al.*, 2015). Entretanto, após 48h de ensaio, os géis de alginato Alg_Ca²⁺ e Alg_CNCT50 desintegraram totalmente e o meio de cultura ficou disponível para as células, o que favoreceu a proliferação celular até as 96h de estudo.

A partir dos ensaios de citotoxicidade realizados pelo método indireto, avaliou-se os possíveis contaminantes tóxicos que podem ser facilmente extraídos dos biomateriais (PARIENTE *et al.*, 2002). Os eluatos dos géis avaliados (Alg_Ca²⁺, Alg_CNCT50 e Alg_NFCT50) mostraram atividade não citotóxica à levemente citotóxica (com viabilidade celular entre 75-98%) e apresentam excelente perfil de citocompatibilidade (Figura 5.26b).

Embora todos os materiais avaliados tenham apresentado boa citocompatibilidade com as células de fibroblastos L929, os géis Alg_Ca²⁺ e Alg_CNCT50, de menor estabilidade física, desintegraram no meio de cultura após o primeiro contato. Por essa razão, faz-se necessária uma maior investigação a respeito das características de tais materiais para que possam ser considerados como substratos potenciais para engenharia de tecidos ou agentes de suporte ao crescimento celular. Uma aplicação interessante para os géis Alg_CNCT50 seria utilizá-los como curativos, principalmente em função das propriedades do alginato de reticulação *in situ*, à presença de íons cálcio nos exsudatos (Coviello *et al.*, 2007) e à presença de grupos -COO⁻ na superfície dos CNCT que podem influenciar na absorção de proteínas e, consequentemente, na proliferação celular e cicatrização das feridas.

Por outro lado, os géis contendo NFCT (Alg_NFCT50), que formam redes poliméricas semi-IPNs com os géis de alginato, mantiveram a estabilidade dimensional. Apresentaram as melhores condições de citocompatibilidade e favoreceram a adesão e o crescimento de fibroblastos em sua superfície. Alexandrescu *et al.* (2013) também realizaram testes de citotoxicidade em NFCT, utilizando células de fibroblastos. Concluíram que estes materiais nanoestruturados celulósicos não eram tóxicos e destacaram a importância das NFCT para a medicina regenerativa e cicatrização de feridas. Portanto, as demais investigações para este estudo foram concentradas nas amostras do gel Alg_NFCT50.

A caracterização morfológica e microestrutural dos fibroblastos, semeados no gel Alg_NFCT50, foi realizada através da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras após 2, 4 e 7 dias de incubação (Figura 5.26).

Os resultados revelaram a presença dos fibroblastos principalmente dentro dos poros do gel; mas estavam também presentes na superfície do gel, frequentemente em monocamadas de cultura (Figura 5.27 a-b) e sobre as NFCT (Figura 5.27 b-c). Além disso, a morfologia das células foi mantida esférica e em formato estendido. O formato esférico pode ser um indicativo de que as células estavam crescendo e tendo uma considerável capacidade de proliferação, após 7 dias de incubação (NASERI *et al.*, 2016).

Também é interessante observar que na superfície rugosa do gel Alg_NFCT50 (Figura 5.27 a-b) há presença de filamentos saindo das células, o que poderá auxiliar a sua migração (através das superfícies porosas) e promover a interação entre as células. Como já descrito ao longo deste estudo, o tamanho dos poros de um biomaterial afeta a adesão, proliferação e diferenciação celular; portanto, os poros do gel devem ser pequenos o suficiente para assegurar a integridade mecânica do material, porém grandes para permitir o crescimento celular e a difusão de nutrientes no tecido (LIU *et al.*, 2015).

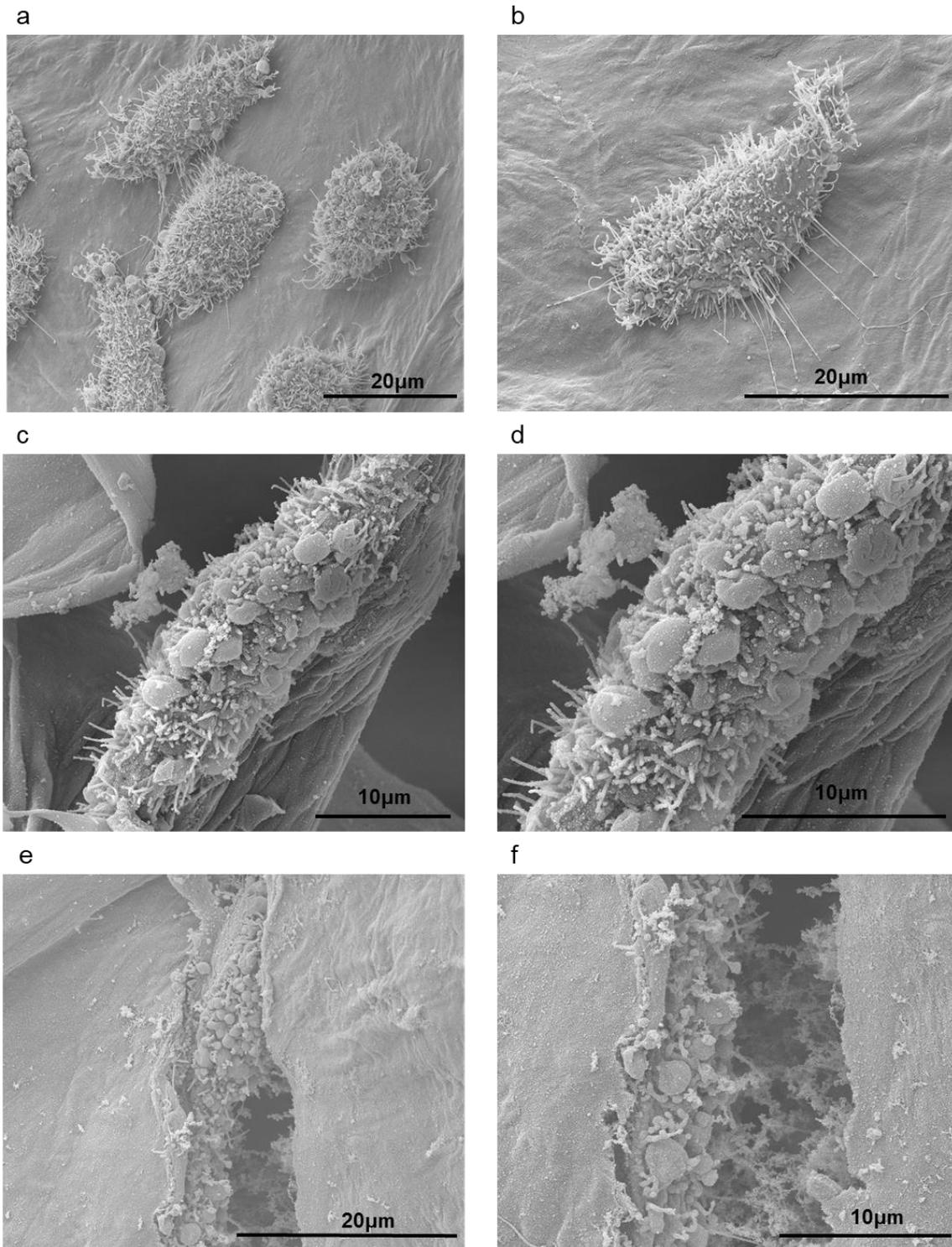


Figura 5.27. Micrografias MEV de células de fibroblastos L929 semeadas no gel de alginato e nanofibra de celulose TEMPO-oxidada (50% m/m) – Alg_CNFT50: 2 dias de incubação com

magnificação de 4000 x (a) e 6000 x (b); 4 dias de incubação com magnificação de 4000 x (c) e 6000 x (d); 7 dias de incubação com magnificação de 6000 x (e) e 10000 x (f).

A partir da análise da Figura 5.27 pode-se observar também uma boa adesão das células de fibroblastos L929, após 7 dias de incubação, nas amostras do gel Alg_NFCT50. Tal fato pode ser atribuído à estrutura dos poros do material e ao grande número de sítios para adesão celular. As NFCT, além de auxiliarem na estabilidade dimensional das amostras do gel Alg_NFCT50, proporcionaram uma estrutura para as paredes dos poros muito semelhante à matriz extracelular natural; além disso, as cadeias de alginato, com características hidrofílicas, também podem ter contribuído para a fixação das células no material (SKAUGRUD *et al.*, 1999; DOMINGUES *et al.*, 2014).

Sendo assim, a partir dos resultados obtidos ao longo deste estudo, pode-se destacar o potencial dos géis de alginato e nanoceluloses, mais especificamente, dos géis de alginato e nanoceluloses TEMPO-oxidadas (50% m/m), para possíveis aplicações biomédicas. Os géis Alg_CNCT50 e Alg_NFCT50 apresentaram-se citocompatíveis e os ensaios de crescimento celular *in vitro* nos géis Alg_NFCT50 reforçaram a sua relevância, principalmente na engenharia de tecidos.

5.3 Géis de alginato/ quitosana e nanoceluloses

Sabe-se que os géis podem ser classificados em relação à natureza dos grupos químicos presentes, em relação ao método de preparação, dentre outros. As características estão intimamente relacionadas à forma como os materiais estão interligados: reticulação física ou química (HAMIDI *et al.*, 2008).

Nesta seção, para síntese dos novos géis, utilizou-se polímeros naturais, biodegradáveis, extremamente abundantes e atóxicos: quitosana, alginato e nanoceluloses. A quitosana é um material potencialmente atraente para usos diversos, principalmente em engenharia, biotecnologia e medicina (ASSIS *et al.*, 2003). Sua estrutura, formada pela repetição de unidades beta (1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose, apresenta uma cadeia polimérica similar à da celulose e, quando protonada, em meio ácido, é considerada um polycation. O alginato de sódio é um polímero de cadeias lineares solúveis

em meio aquoso, conhecido por suas propriedades curativas e antitumorais. É constituído por várias unidades de sais de ácido β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G) unidas por ligações glicosídicas (SOUZA *et al.*, 2008) e, portanto, é considerado um poliânion. Assim, a combinação desses dois importantes polissacarídeos, a partir da interação eletrostática entre os grupos amino da quitosana com os grupos carboxilatos do alginato (em pH 5,3), é capaz de formar um sistema dimensionalmente mais estável, com propriedades mecânicas e biológicas mais atraentes para aplicações biomédicas, quando comparado aos géis dos polímeros isolados (alginato e quitosana) (LI *et al.*, 2005).

Em função das características físico-químicas dos polieletrólitos quitosana e alginato, somada à necessidade de se otimizar o processo de obtenção e as propriedades finais dos géis de alginato e nanoceluloses (seção 5.2 do presente estudo), um sistema alginato/ quitosana e nanocelulose foi proposto, utilizando-se CaCl_2 como agente de reticulação para os grupos $-\text{COO}^-$ disponíveis no sistema. Sabe-se que em soluções aquosas, com pH entre 3,5 e 6,5, os grupos amino da quitosana interagem com os grupos carboxilatos do alginato com formação de um complexo iônico polimérico (BERGER *et al.*, 2004). A Figura 5.28 apresenta, esquematicamente, as possíveis interações iônicas e/ ou ligações secundárias presentes no material em estudo: (a) reticulação iônica entre as cadeias de alginato e íons Ca^{2+} ; (b) reticulação iônica entre as cadeias de alginato, das nanoceluloses TEMPO-oxidadas e íons Ca^{2+} ; (c) interações entre os grupos $-\text{OH}$ das cadeias das nanoceluloses (ligação de hidrogênio); (d) e (e) interações iônicas entre os grupos aniônicos do alginato ou das nanoceluloses TEMPO-oxidadas e os grupos catiônicos da quitosana protonada.

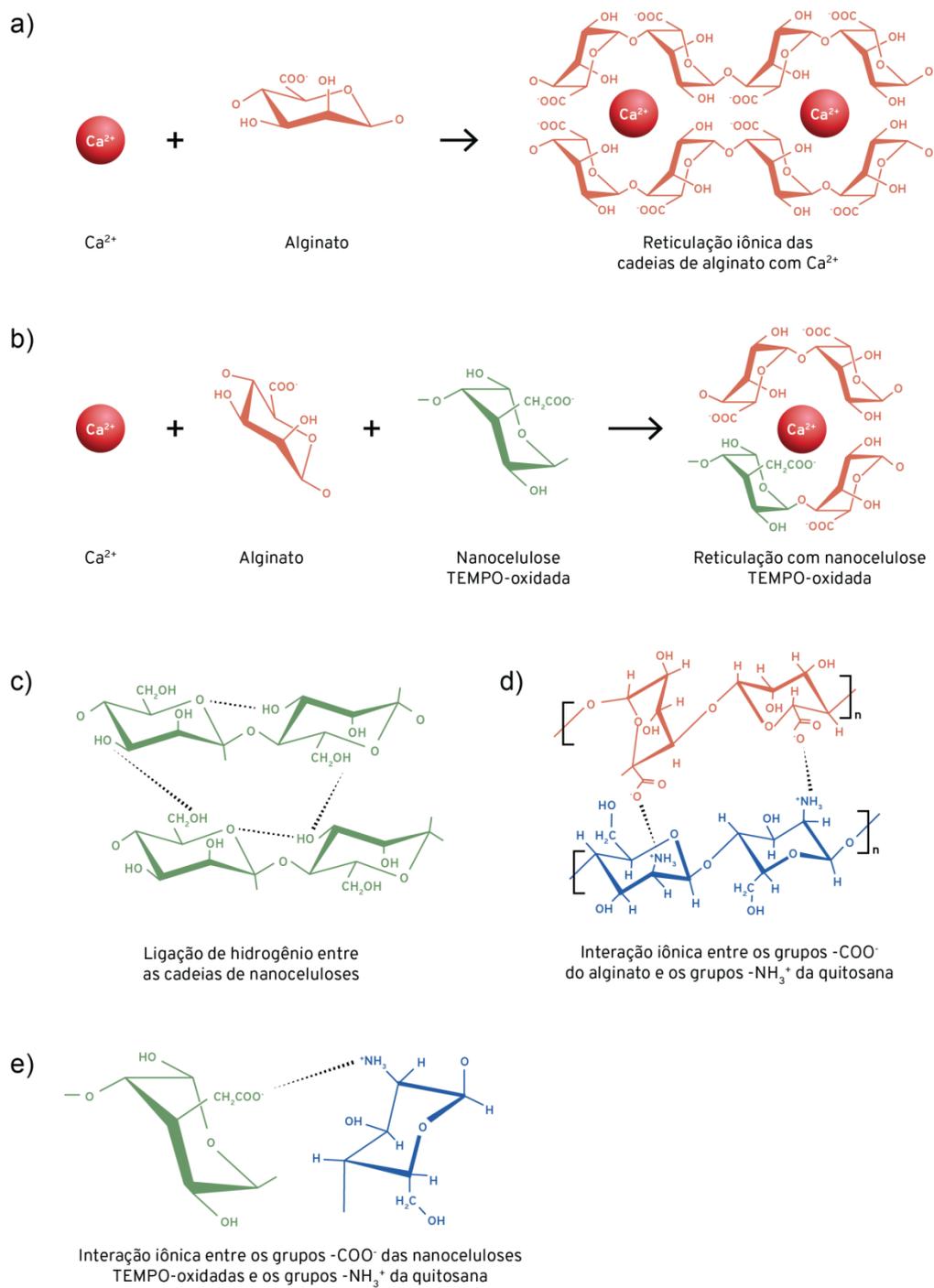
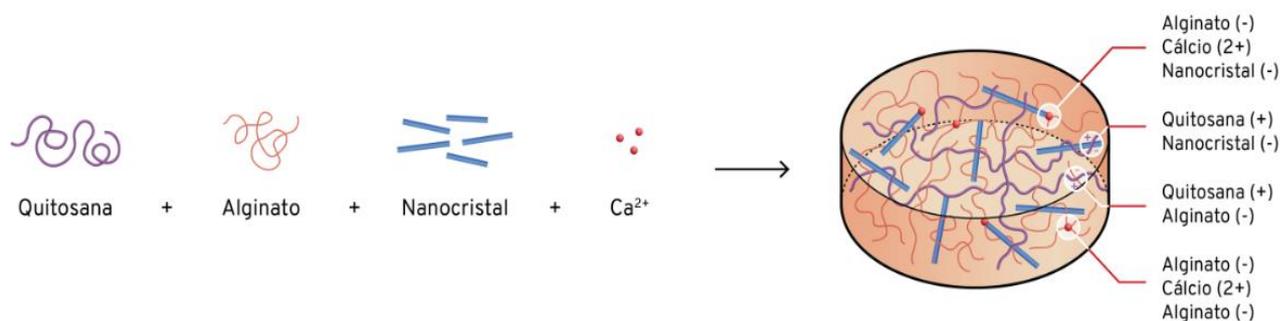


Figura 5.28: Mecanismos para as possíveis interações/ reticulações nos géis de alginato/ quitosana e nanoceluloses.

A fim de ilustrar/ demonstrar a participação das nanoceluloses na estabilidade dimensional dos géis de alginato/ quitosana e nanoceluloses apresenta-se as Figuras 5.29 (a-b) e 5.30 (a-b).

A Figura 5.29 propõe um esquema para a formação dos géis de alginato/ quitosana e nanoceluloses oxidadas (Alg_Qui_NFCT e Alg_Qui_CNCT), ilustrando as possíveis reticulações iônicas entre os grupos -COO^- disponíveis nos sistemas e os grupos -NH_3^+ da quitosana protonada e reticulações iônicas entre os grupos -COO^- e os íons Ca^{2+} . Ressalta-se que, para o presente esquema, meramente ilustrativo, não foram consideradas as proporções entre as dimensões das NFCT e CNCT.

(a)



(b)

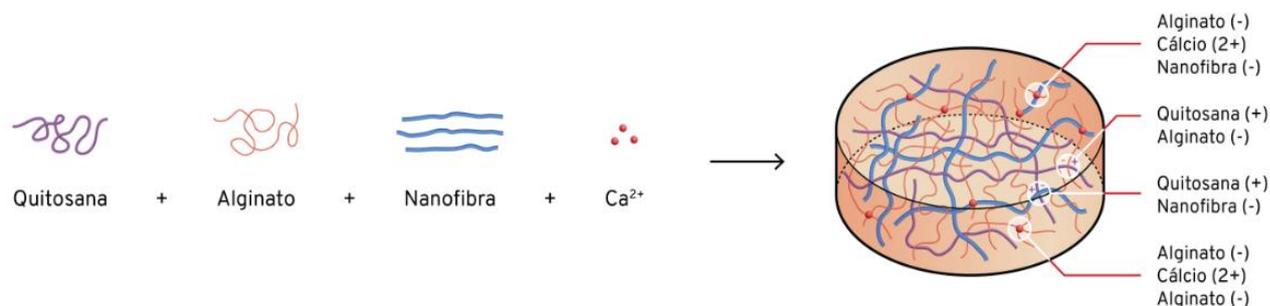
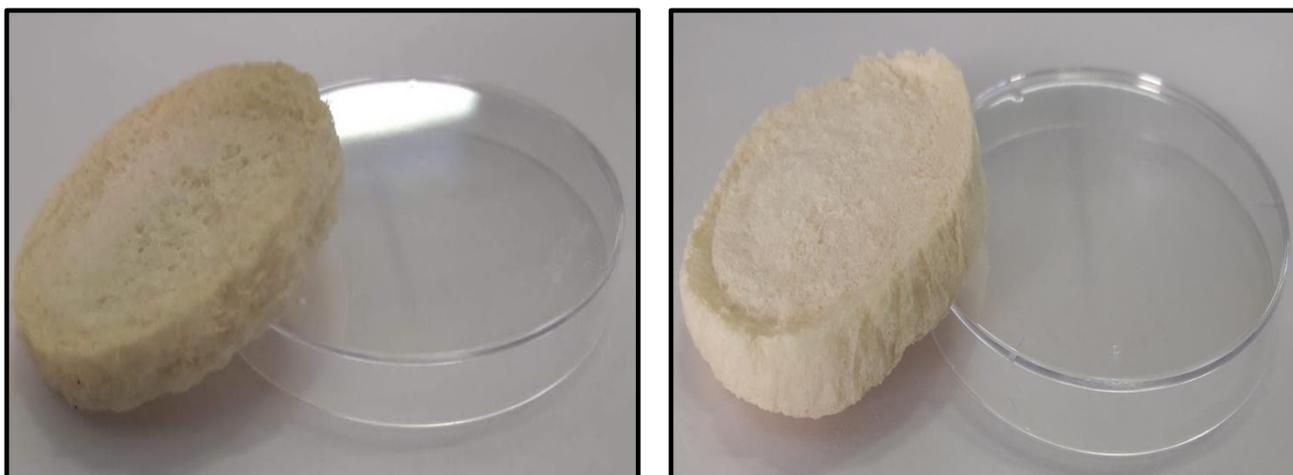


Figura 5.29: Representação esquemática dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana/ e nanoceluloses - alginato/ quitosana e CNCT (a); alginato/ quitosana e NFCT (b).

Os géis poliméricos, formados por estruturas que se mantêm como resultado de interações intra ou intermolecular (como ligações iônicas, ligações de hidrogênio, entre outras), são denominados géis físicos; os géis obtidos por complexos iônicos podem ser considerados uma subcategoria dos géis físicos, devido à natureza reversível das interações iônicas que caracterizam a estrutura do gel. Os complexos iônicos, por sua vez, podem ser divididos em géis ionicamente reticulados e os complexos polieletrólíticos (PEC), que são formados por um par de polímeros iônicos de cargas contrárias (ABREU *et al.*, 2008). Sabendo também que outra classificação para os géis é quanto à formação de redes poliméricas, os géis físicos, polieletrólíticos de alginato, quitosana e nanoceluloses, foram classificados, no presente estudo, como *géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses*.

Conforme esquematizado nas Figuras 5.28 e 5.29, interações iônicas entre os grupos -NH_3^+ da quitosana protonada (em meio ácido) e os grupos aniônicos do alginato e das nanoceluloses TEMPO-oxidadas (-COO^-) são esperadas, além da reticulação iônica entre os grupos -COO^- (livres na estrutura polimérica) e íons Ca^{2+} . Ressalta-se, portanto, que apesar do entrelaçamento entre as cadeias, as mesmas podem ser separadas sem envolver quebras de ligação química.

A Figura 5. 30 (a-b) apresenta uma imagem dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (50% (m/m)).



(a)

(b)

Figura 5.30: Imagem dos géis Alg_Qui_CNCT50 (a) e Alg_Qui_NFCT50 (b)

Não foram observadas alterações macroscópicas significativas, como formação de trincas e/ ou aglomerados, quando se compara os géis de alginato e quitosana contendo CNCT ou NFCT, diferentemente dos géis de alginato e nanoceluloses (seção 5.2 do presente estudo).

5.3.1 Caracterização física, química e biológica dos géis semi-IPNs de alginato/ quitosana e nanoceluloses

Para investigação das propriedades químicas, físicas e biológicas dos géis semi-IPNs de alginato/ quitosana e nanoceluloses foram realizadas análises semelhantes às utilizadas para o gel de alginato e nanoceluloses (apresentadas na seção 5.2 do presente estudo). Análises de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR-ATR), análises térmicas (TGA/ DTG) e DRX foram realizadas a fim de evidenciar possíveis interações entre os polímeros alginato, quitosana e as diferentes nanoceluloses adicionadas aos sistemas. O grau de inchamento dos géis em água milli-Q, tampão fosfato com pH 3,0, pH 7,4 e pH 9,0, a 25 e 37°C, foi determinado a fim de avaliar o comportamento deste sistema polieletrólítico em diferentes condições de pH e temperatura. Para estudar as características estruturais dos géis, análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise de porosidade

por micro-CT foram realizadas. O comportamento mecânico dos géis, bem como a influência da concentração das nanoceluloses e do tipo de nanocelulose (CNC, CNCT, NFC e NFCT) nas propriedades mecânicas dos géis, foi estudado a partir de ensaios de compressão termomecânicos (TMA) e DMTA. Por fim, realizou-se ensaios de citotoxicidade e o crescimento celular sobre amostras dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses, visando avaliar o potencial destes novos materiais para aplicações biomédicas.

Assim como observado para os géis de alginato e nanoceluloses (seção 5.2), as amostras dos géis de alginato e quitosana contendo 10% (m/m) de nanoceluloses apresentaram menor estabilidade dimensional e algumas características macroscópicas indesejáveis para o presente estudo, como trincas e/ou formação de aglomerados (conforme apresentado na Figura 5.31).

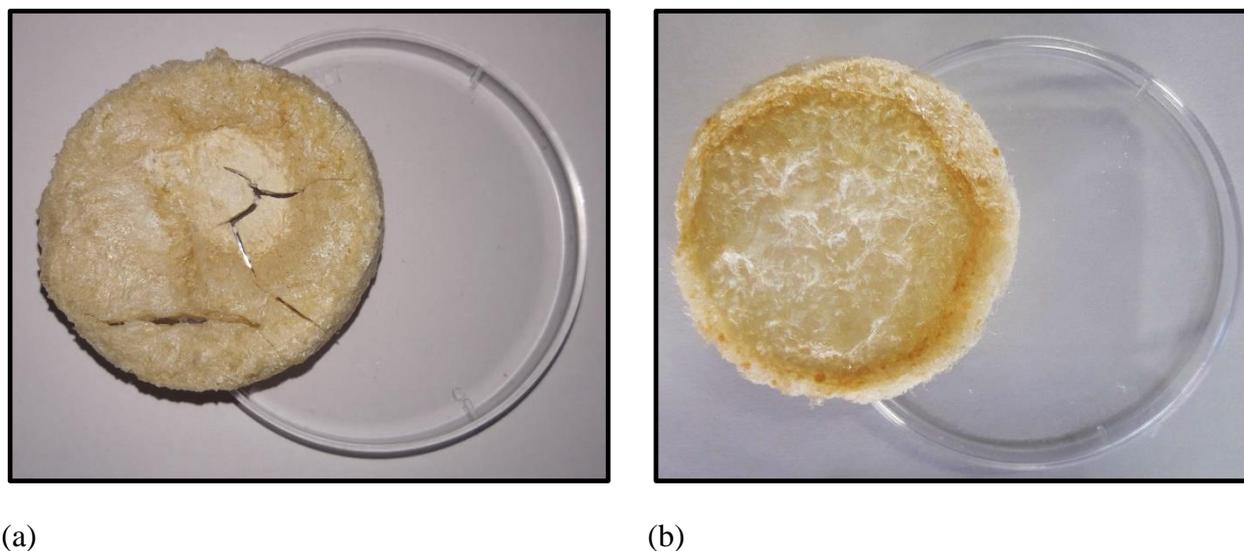


Figura 5.31: Imagem dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses 10% (m/m) – Alg_Qui_CNCT10 (a) e Alg_Qui_NFCT10 (b).

Novamente, acredita-se que uma concentração ótima de nanoceluloses para os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses esteja entre 36 e 50% (m/m). E assim, as análises de FTIR-ATR, DRX, micro-CT, TMA, DMTA e citotoxicidade dos materiais foram realizadas apenas com amostras dos géis preparados com 36% e/ ou 50% (m/m) de nanoceluloses.

- ***Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier e Reflexão Total Atenuada (FTIR - ATR)***

No presente estudo, a formação dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses ocorre pela interação eletrostática entre os grupos -COO^- do alginato e os grupos NH_3^+ da quitosana protonada, além da reticulação iônica dos grupos -COO^- , disponíveis no sistema, com os íons Ca^{2+} adicionados aos mesmos. O elevado grau de desacetilação da quitosana, utilizada no presente estudo (GD 93%), resultou em interações entre as cadeias da quitosana e alginato de sódio: géis semi-IPNs de maior estabilidade dimensional em condições fisiológicas foram obtidos, quando comparados aos géis de alginato e nanoceluloses (apresentados na seção 5.2 do presente trabalho). A fim de confirmar as interações físicas entre os polieletrólitos alginato/ quitosana e nanoceluloses, além das reticulações entre os íons cálcio e os grupos -COO^- disponíveis no sistema, análises de espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas.

As Figuras 5.32 e 5.33 apresentam os espectros de FTIR dos polímeros alginato e quitosana e dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (36% m/m), respectivamente.

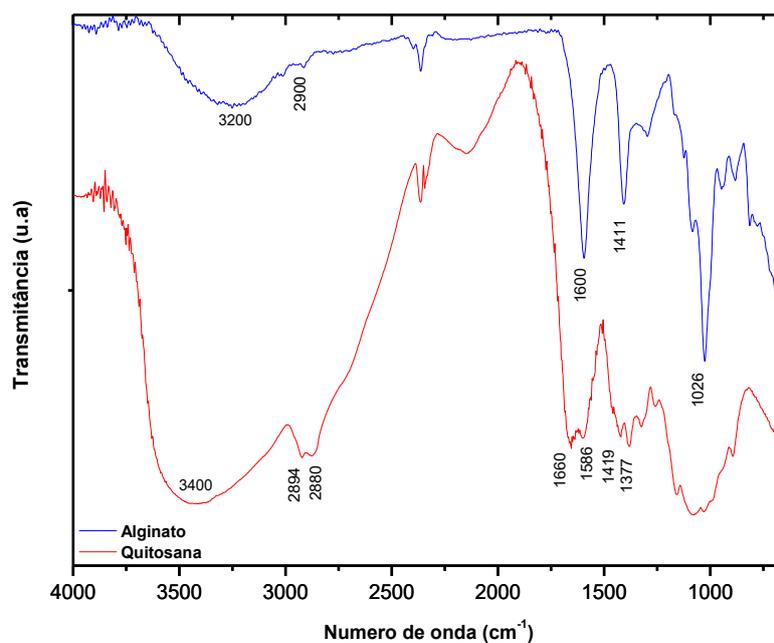


Figura 5.32: Espectros de FTIR-ATR da quitosana e do alginato utilizados para a obtenção dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses.

Como apresentado nas seções 5.1 e 5.2 do presente estudo, cita-se como principais bandas de absorção para o alginato e nanoceluloses: banda larga em $3600 - 3200\text{cm}^{-1}$ característica de estiramento O-H; em 2900cm^{-1} banda devido ao estiramento das ligações C-H de CH_2 e CH_3 ; bandas de estiramento dos grupos carboxílicos ($-\text{COO}^-$) em aproximadamente 1600cm^{-1} para os estiramentos assimétricos e 1411cm^{-1} para os estiramentos simétricos do alginato e nanoceluloses TEMPO-oxidadas.

O espectro de FTIR da quitosana é caracterizado por bandas de absorção nas seguintes regiões: uma banda de absorção larga e intensa em números de onda próximos a 3300cm^{-1} é atribuída ao estiramento axial das ligações O-H e N-H; bandas em 2940 e 2880cm^{-1} , correspondentes ao estiramento axial simétrico e assimétrico das ligações C-H; bandas em 1660cm^{-1} e em 1586cm^{-1} , atribuídas ao estiramento C=O (conhecida como banda de amida I) e a deformação N-H de aminas; bandas em 1419 e 1377cm^{-1} resultantes da combinação do estiramento axial de C-N e da deformação angular de N-H.

As bandas entre 800 e 1200cm^{-1} , em ambos os polímeros, está relacionada com a estrutura polissacarídica. Estes picos correspondem a uma região chamada de “Impressão Digital” (*Finger print*) que é característica de cada polissacarídeo.

A interação entre a quitosana e o alginato leva à formação de complexos eletrolíticos, cuja interação iônica pode ser observada através de alterações nos modos vibracionais dos grupamentos principais da quitosana e do alginato (LI *et al.*, 2005). Indícios da interação entre os polieletrólitos presentes nos sistemas podem estar associados ao alargamento da banda próxima a 1600cm^{-1} e/ ou à formação do ombro observado para os géis Alg_Qui_CNCT36 e Alg_Qui_NFCT36 (1550cm^{-1}). Segundo Li *et al.* (2008), o deslocamento das bandas de absorção da quitosana (devido às deformações N-H) de 1586cm^{-1} para 1550cm^{-1} pode estar associado à interação da quitosana com o alginato. Neste estudo, pode-se observar uma banda larga próxima a $1600 - 1550\text{cm}^{-1}$ para todos os géis de alginato/ quitosana e nanoceluloses, com um ombro proeminente em 1550cm^{-1} para os géis contendo CNCT ou NFCT (36% m/m) - Alg_Qui_CNCT36 e Alg_Qui_NFCT36, além de uma banda a 1411cm^{-1} . As duas bandas principais (1600cm^{-1} e 1411cm^{-1}) são atribuídas às vibrações C=O dos grupos carboxilatos do alginato e das nanoceluloses TEMPO-oxidadas, somadas às bandas atribuídas ao estiramento C=O (conhecida como banda de amida I) e a deformação N-H de aminas da quitosana (1660 , 1586cm^{-1}). As bandas em 1151cm^{-1} e $1053 - 1026\text{cm}^{-1}$ correspondem à estrutura polissacarídica, incluindo as ligações glicosídicas, estiramentos dos grupos C-O-C/ C-N e C-O. Uma banda larga e intensa, em torno de 3300cm^{-1} , pode ser observada e corresponde ao estiramento axial das ligações N-H da quitosana e O-H dos polissacarídeos alginato, quitosana e nanoceluloses; bandas próximas a 2890cm^{-1} correspondem aos estiramentos das ligações C-H (do alginato, quitosana e nanoceluloses).

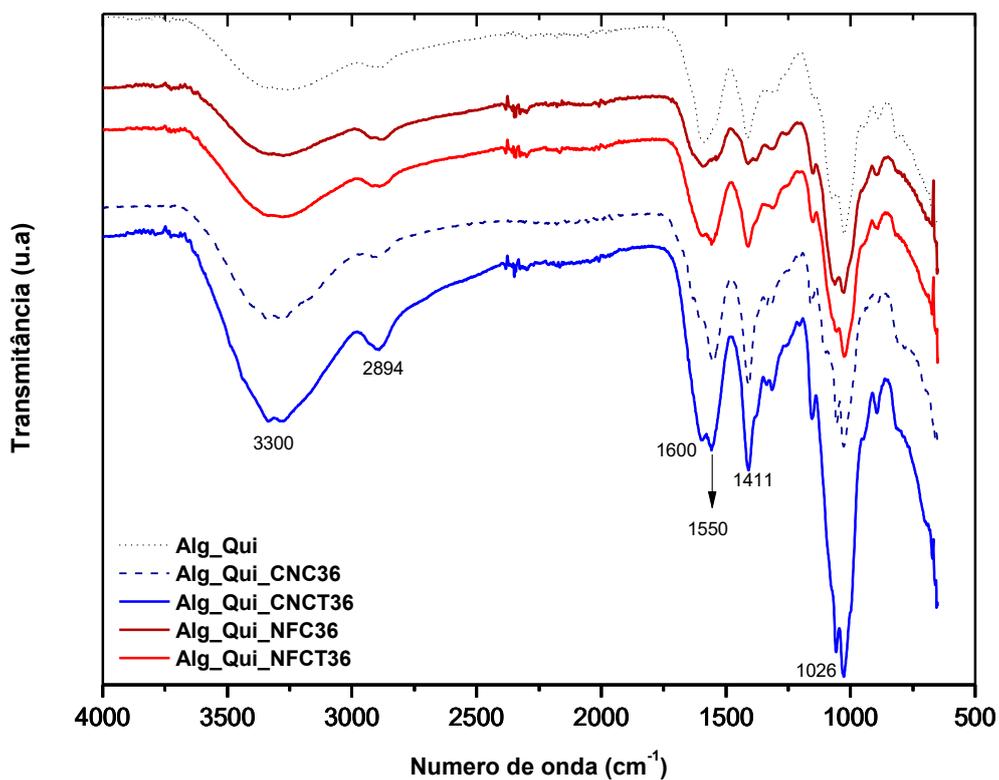


Figura 5.33: Espectros de FTIR-ATR para os géis semi-IPNs de alginato/ quitosana (Alg_Qui) e alginato/ quitosana e nanoceluloses modificadas e sem modificações químicas (Alg_Qui_CNC36; Alg_Qui_CNCT36; Alg_Qui_NFC36; Alg_Qui_NFCT36).

Cabe salientar que, a sobreposição de comprimentos de onda característicos da quitosana e do alginato, quando os espectros dos géis são comparados aos espectros dos polímeros puros, além da ausência de novas bandas após a formação dos géis, também podem ser indicativos que as interações entre o alginato e a quitosana são puramente eletrostáticas entre os grupos -NH_3^+ da quitosana e -COO^- do alginato; não há indício de formação de ligação amídica. Segundo Lawrie *et al.* (2007), a presença das formas iônicas de ambos os polieletrólitos (uma vez que o presente sistema teve o pH ajustado e controlado em 5,3) resulta na formação de um complexo fortemente associado.

- *Análise por Difração de Raio-X dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses*

A Figura 5.34 apresenta o difratograma dos polímeros semi cristalinos alginato e quitosana, utilizados para síntese dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses.

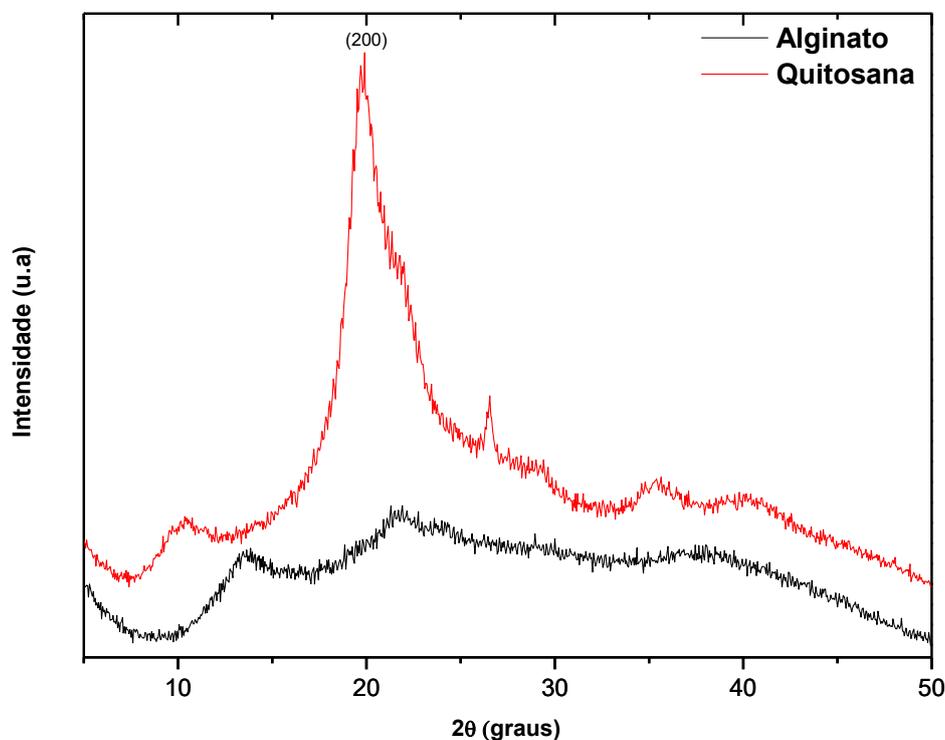


Figura 5.34: Difratograma dos reagentes alginato e quitosana.

O alginato apresenta uma estrutura semicristalina com picos alargados correspondentes aos grupos gulurônicos e manurônicos. A intensidade máxima correspondente aos grupos gulurônicos ocorre no plano (110), em $2\theta = 13,6^\circ$; a intensidade máxima correspondente aos grupos manurônicos ocorre no plano (200), em $2\theta = 21,8^\circ$. O alargamento da fase amorfa ocorre até, aproximadamente, $2\theta = 50^\circ$ (NERY, 2014). Pela análise da Figura 5.34, pode-se perceber para a quitosana, um polímero semicristalino, um pico de intensidade máxima em $2\theta = 19,8^\circ$, que corresponde ao plano principal

(200) e um de menor intensidade em $2\theta = 10,3^\circ$, em função do polimorfismo da estrutura e que corresponde aos planos dos cristais hidratados (LI *et al.*, 2009).

Sabendo que a quantidade de nanocelulose adicionada ao sistema influencia diretamente na cristalinidade dos géis (aumenta a intensidade dos picos de difração da celulose em 2θ aproximadamente, 22°), amostras dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses contendo 50% (m/m) foram selecionadas para as análises de DRX.

A Figura 5.35 apresenta o difratograma dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses 50% (m/m).

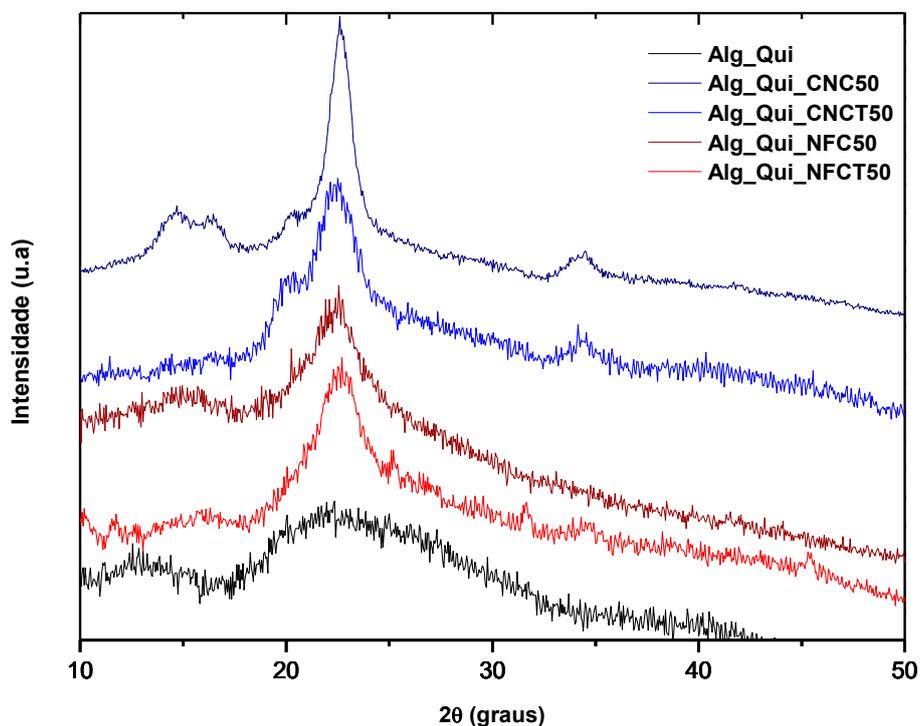


Figura 5.35: Difratograma do gel semi-IPN alginato/ quitosana (Alg_Qui) e dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses 50% (m/m) - Alg_Qui_CNC50; Alg_Qui_CNCT50; Alg_Qui_NFC50; Alg_Qui_NFCT50.

A partir da análise da Figura 5.34, pode-se confirmar que a adição das nanoceluloses (CNC, CNCT, NFC ou NFCT) aos géis semi-IPNs alginato/ quitosana aumenta a cristalinidade do material resultante (com o aparecimento dos picos característicos das regiões cristalinas das nanoceluloses em $2\theta = 22,5^\circ$

e $2\theta = 15,3^\circ$), quando se compara ao gel de semi-IPN alginato/ quitosana, sem adição de nanoceluloses, (Alg_Qui). Como esperado, os géis Alg_Qui_CNC50 e Alg_Qui_CNCT50, onde foram adicionados 50% (m/m) de nanocristais de celulose ($I_C = 90\%$ e 82% , respectivamente) foram os que apresentaram estes picos mais acentuados em $2\theta = 22,5^\circ$.

Pode-se perceber também, comparando-se as Figuras 5.34 e 5.35, uma estrutura mais amorfa para o gel semi-IPN alginato/ quitosana (Alg_Qui) em relação à quitosana pura. Segundo Smitha *et al.* (2005), tal fato pode estar associado à eliminação de ligações de hidrogênio entre os grupos amino e grupos hidroxila da quitosana, durante a síntese do gel. Estes resultados corroboram com aqueles obtidos a partir das análises de FTIR da quitosana e dos géis (Figuras 5.32 e 5.33): houve redução das bandas relacionadas com ligações de hidrogênio que intensificam a vibração de grupos -OH em torno de 3300cm^{-1} (quando se compara com os espectros de FTIR da quitosana pura e dos géis).

- **Análise termogravimétrica (TGA-DTG)**

Para o estudo da estabilidade térmica dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses utilizou-se análise termogravimétrica. As amostras foram submetidas a uma variação constante da temperatura com monitoramento da variação das massas. As Figuras 5.36 e 5.37 apresentam as curvas de degradação térmica (TGA e DTG, respectivamente) dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana (Alg_Qui) e alginato/ quitosana e nanoceluloses (36% m/m): Alg_Qui_CNC36; Alg_Qui_CNCT36; Alg_Qui_NFC36; Alg_Qui_NFCT36).

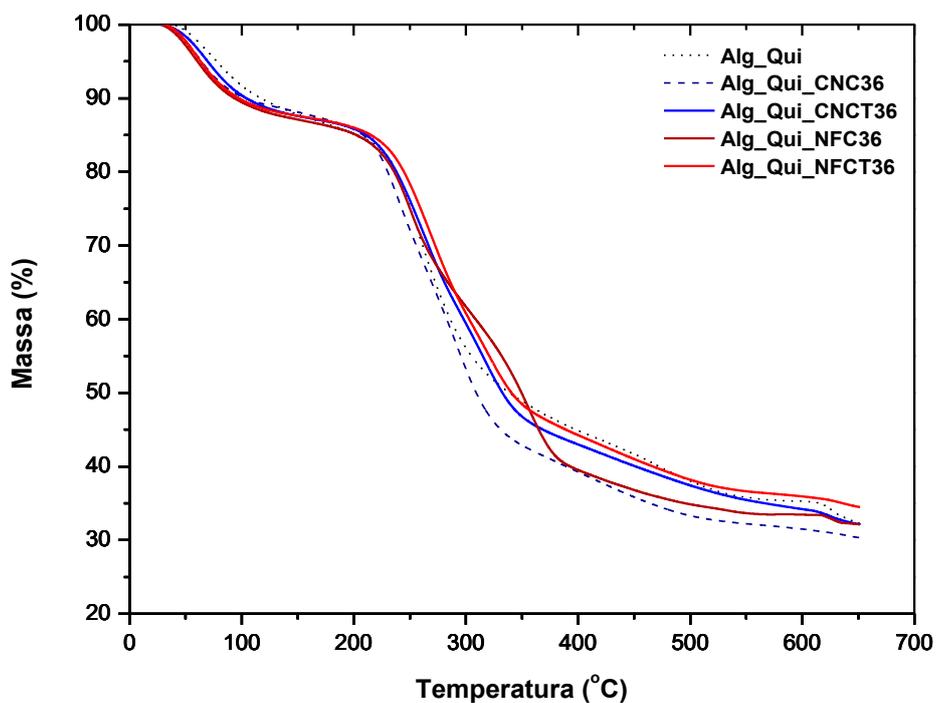
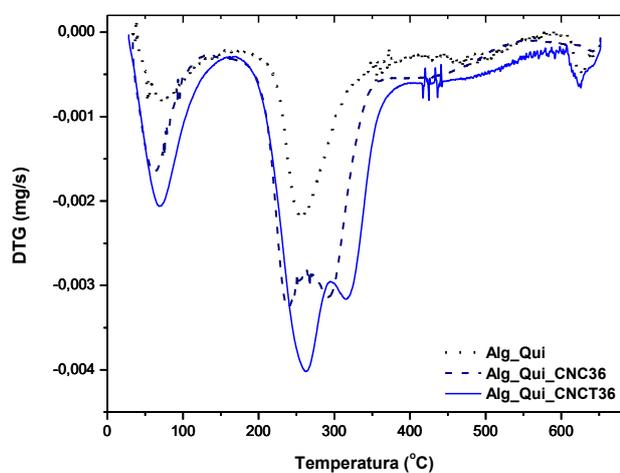
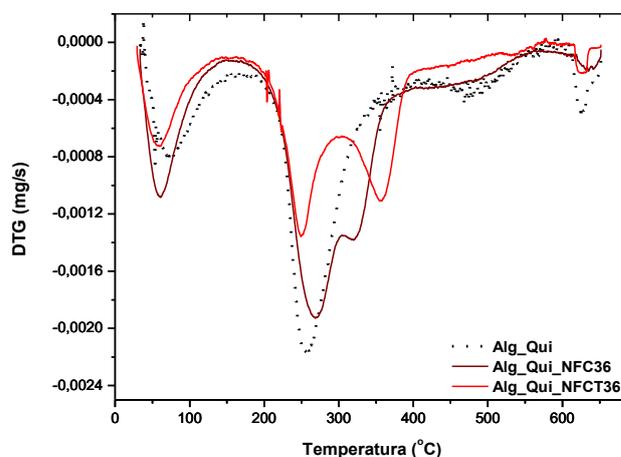


Figura 5.36: Curvas de TGA dos géis semi-IPNs alginato/quitosana e alginato/ quitosana e nanoceluloses (36% m/m) em atmosfera de N₂.



(a)



(b)

Figura 5.37: Curvas de DTG dos géis semi-IPNs alginato/quitosana e alginato/ quitosana e nanoceluloses (36% m/m) em atmosfera de N₂ – Alg_Qui_CNC36 e Alg_Qui_CNCT36 (a); Alg_Qui_NFC36 e Alg_Qui_NFCT36 (b).

Pode-se observar, a partir da análise das Figuras 5.36 e 5.37, três principais eventos de perda de massa: o primeiro entre 20 e 175°C, com perda de, aproximadamente, 15% da massa inicial o que corresponde à perda de água e de outros componentes voláteis presentes no sistema.

No segundo evento (entre 175 e 385°C) tem-se uma perda de massa de, aproximadamente, 40% correspondente à degradação complexa dos glicosídeos presentes na estrutura dos biopolímeros alginato, quitosana e nanoceluloses. Pode-se observar, para o início deste evento, uma ligeira diminuição da estabilidade térmica dos géis de alginato/ quitosana e NFC ou NFCT (com temperatura inicial de degradação igual a 167 e 160°C, respectivamente) quando comparados aos demais géis de alginato e quitosana. Tal fenômeno pode ser justificado pela presença das hemiceluloses na estrutura das nanofibras que apresentam temperatura de degradação térmica inferior à da celulose (YANG *et al.*, 2007; LIAO, 2003). Além disso, segundo Isogai *et al.* (2011), a formação de carboxilatos de sódio a partir das hidroxilas primárias C6 na superfície das nanoceluloses, devido à oxidação mediada por TEMPO, leva a uma diminuição no ponto inicial de degradação térmica do material (gel Alg_QUI_NFCT36). Porém, acredita-se que estes mesmos grupos carboxilatos (na superfície das NFCT) tenham participação no processo de reticulação iônica das cadeias de alginato e íons cálcio no gel Alg_QUI_NFCT36, o que resultou em uma maior estabilidade térmica final para estas amostras.

O terceiro evento (a partir de 385°C) ocorre devido à degradação de resíduos carbônicos para formação de produtos gasosos de baixa massa molar. Os resíduos do processo de degradação, após 650°C, podem também ser atribuídos aos compostos contendo cálcio, uma vez que os íons Ca^{2+} foram utilizados como agente reticulante neste estudo, e à interação eletrostática entre o alginato, a quitosana (HAN *et al.*, 2009) e as nanoceluloses, resultando em uma maior estabilidade térmica das amostras.

No presente estudo, avaliou-se o efeito da concentração das nanoceluloses nos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (Figura 5.38).

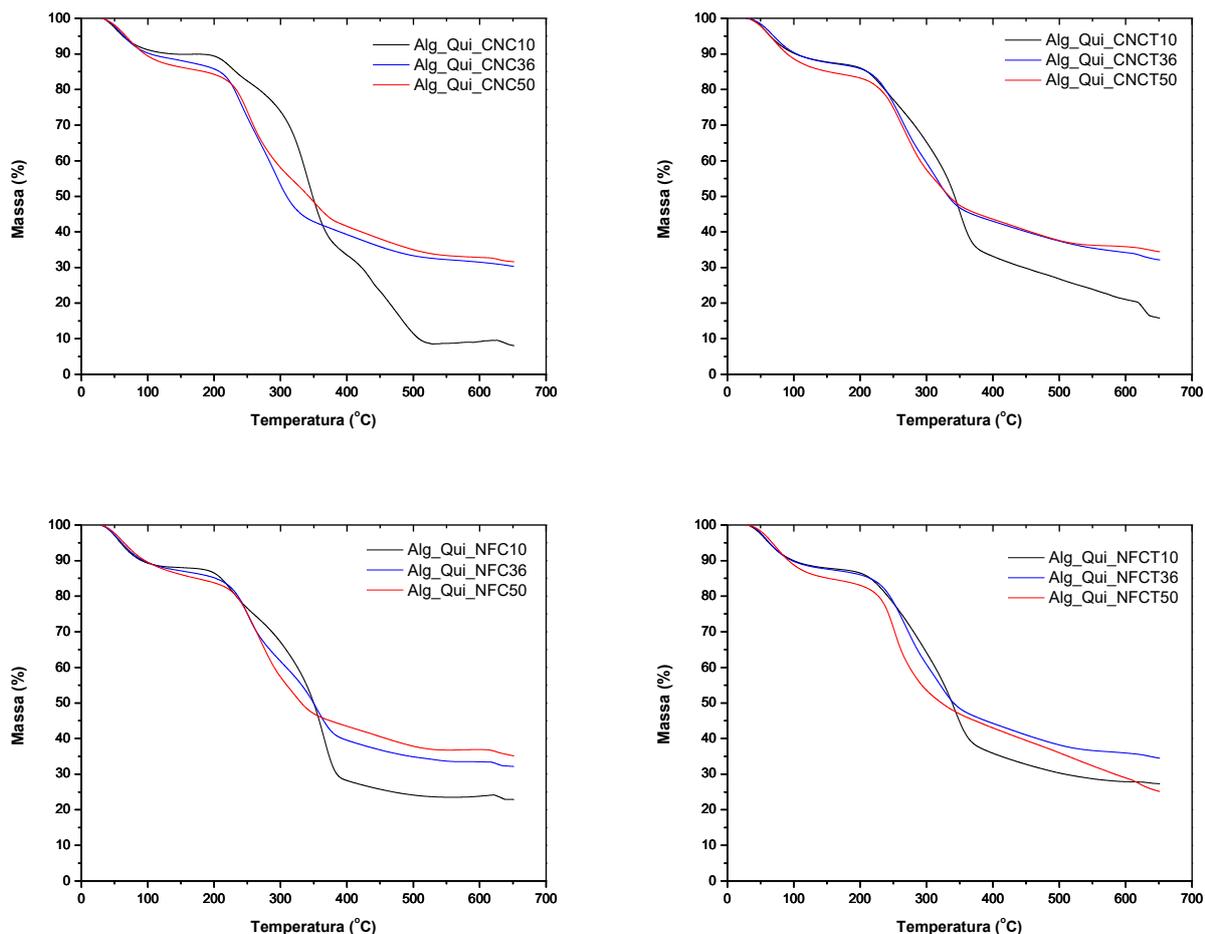


Figura 5.38: Curvas de TGA dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses em diferentes concentrações (10, 36 e 50% m/m), em atmosfera de N₂.

A partir da análise da Figura 5.38 pode-se perceber um comportamento semelhante para todos os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses com concentração de 36% e 50% (m/m). Porém, os géis com apenas 10% (m/m) de nanoceluloses apresentaram um menor percentual de resíduos após 650°C.

Tal fato pode ser justificado por uma menor quantidade de íons Ca²⁺ esperada para estas amostras em função das características morfológicas das mesmas (poros menores e mais heterogêneos). Além

disso, a menor homogeneidade do sistema alginato/ quitosana e nanoceluloses 10% (m/m), resulta em uma diminuição nas interações entre as cadeias poliméricas do sistema polieletrólítico e, conseqüentemente, em estruturas com menor estabilidade térmica.

5.3.2 Propriedades morfológicas dos géis de alginato e nanoceluloses

- *Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microtomografia de raios-X (micro-CT)*

A variação das condições de reação, a partir da adição de diferentes nanoceluloses aos géis de alginato e quitosana, influenciou nas interações entre os polieletrólitos e formando géis com diferentes morfologias. Análises de microscopia eletrônica de varredura (Figura 5.39) e micro-CT (Figuras 5.40 e 5.41) foram realizadas para os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses, a fim de se conhecer o tamanho dos poros dos materiais, a sua distribuição, interconexão e porosidade total, de grande importância para as propriedades finais dos géis.

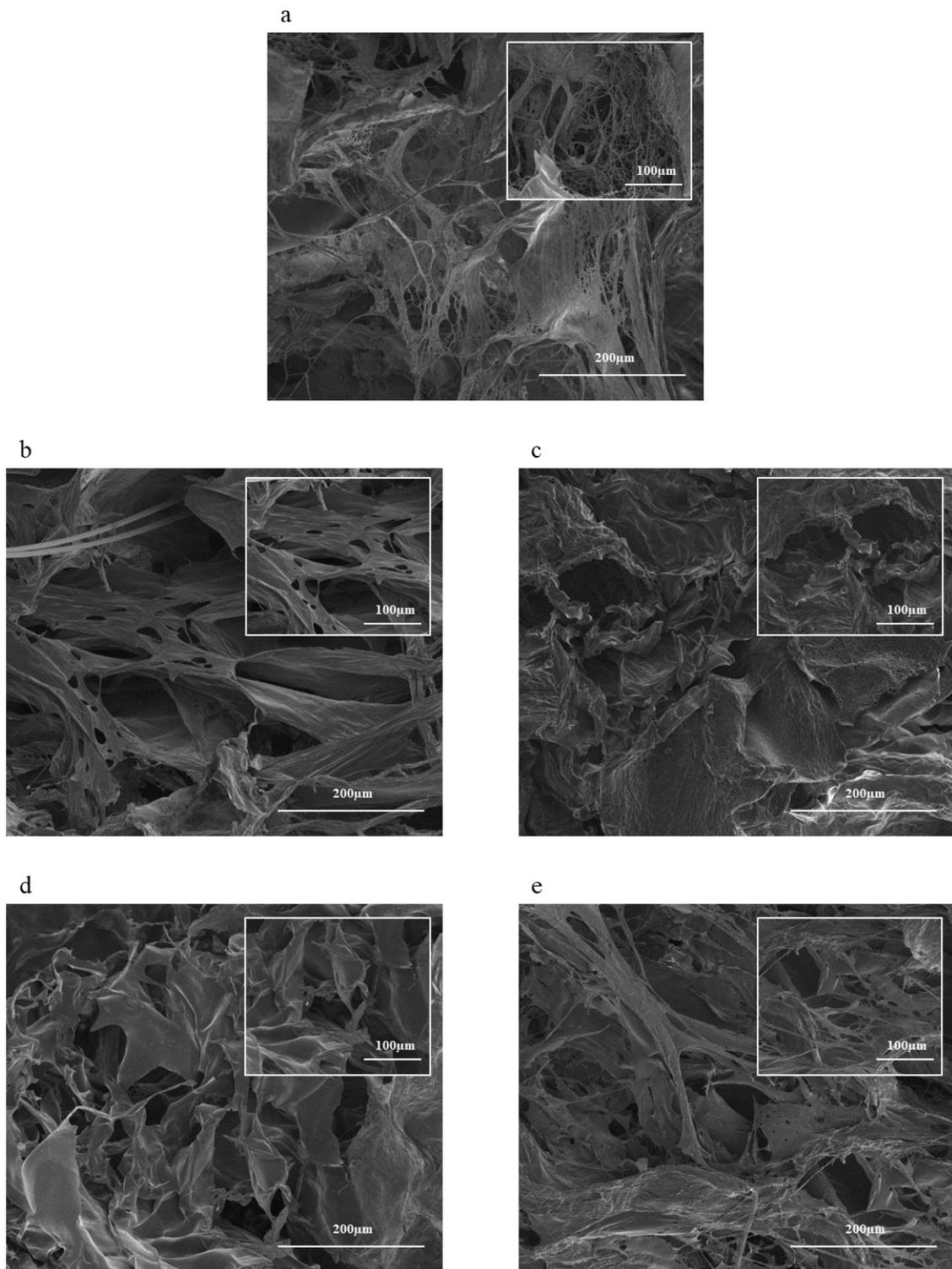


Figura 5.39 Caracterização morfológica do gel semi-IPN alginato/ quitosana (Alg_Qui) (a); e dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (50% m/m) - Alg_Qui_CNC50 (b);

Alg_Qui_CNCT50 (c); Alg_Qui_NFC50 (d); Alg_Qui_NFCT50 (e). Magnificação de 500 x. As inserções representam uma magnificação de 1000 x.

A partir da análise das micrografias MEV da seção transversal dos géis criofraturados com nitrogênio líquido (Figura 5.39) estruturas altamente porosas e de paredes finas, típicas de materiais liofilizados (SEHAQUI *et al.*, 2011) foram encontradas. Pode-se observar uma morfologia semelhante à dos géis de alginato e nanoceluloses (seção 5.2), porém percebe-se um material mais denso, de paredes rugosas, sugerindo géis mais resistentes e de melhor bioadesão se comparados aos géis de alginato. Tal fato pode ser justificado, principalmente, em função das interações eletrostáticas entre os polímeros alginato, quitosana e nanoceluloses TEMPO-oxidadas.

Aqui também, a adição de nanoceluloses aos géis exerceu um papel fundamental na organização e estruturação dos materiais, em especial para aqueles contendo NFC e NFCT. Com maior estabilidade dimensional, os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (Alg_Qui_CNC50, Alg_Qui_CNCT50, Alg_Qui_NFC50 ou Alg_Qui_NFCT50), apresentaram poros com tamanhos médios entre 60 e 80 μ m (Figura 5.39 b-e), interconectados, de grande importância na absorção de líquidos e demais propriedades físico-químicas e mecânicas. Tais características são essenciais para possíveis aplicações em engenharia de tecidos, vista a importância de se combinar o tamanho dos poros e a resistência mecânicas em biomaterias (CALIARI e BURDICK, 2016).

Para o gel Alg_Qui (sem adição de nanoceluloses) pode-se observar um material mais heterogêneo, com tamanho de poros variando entre 1 e 115 μ m (Figura 5.39 a) que também pode ser justificado pela complexidade deste sistema: interações iônicas entre as cadeias de quitosana e alginato, entre as cadeias de alginato e íons Ca^{2+} , além das interações secundárias intramoleculares e entre as cadeias poliméricas

Para melhor avaliar a morfologia dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses, amostras contendo CNCT e NFCT (50% m/m) também foram analisadas por micro-CT. As Figuras 5.40 e 5.41 apresentam as imagens obtidas por micro-CT para os géis Alg_Qui_CNCT50 e Alg_Qui_NFCT50, respectivamente. Ressalta-se novamente, que apesar da resolução espacial das imagens de micro-CT ser de, aproximadamente, 10 pixels, as informações obtidas para porosidade total a partir desta técnica

foram consideradas as mais apropriadas para o material em estudo, em função das características físicas e químicas dos géis.

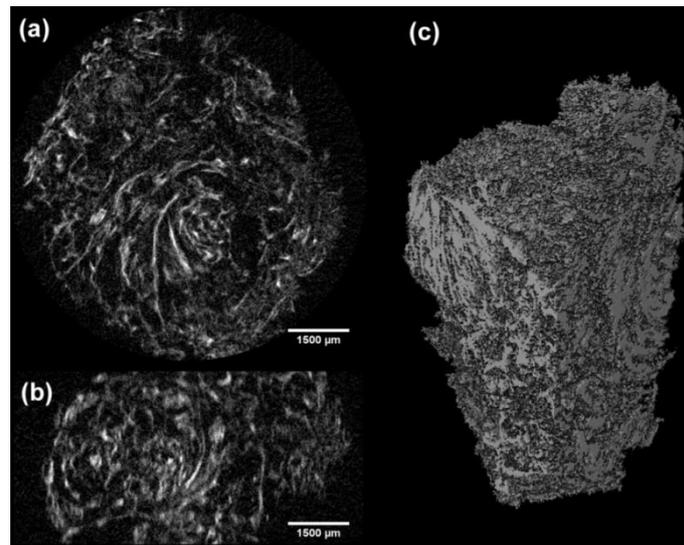


Figura 5.40: Imagens de microtomografia de raios-X do gel semi-IPN alginato/ quitosana e CNCT 50% (m/m) - Seções transversais da amostra (a - b); volume da amostra exibindo arranjo de sua parede em 3D (c).

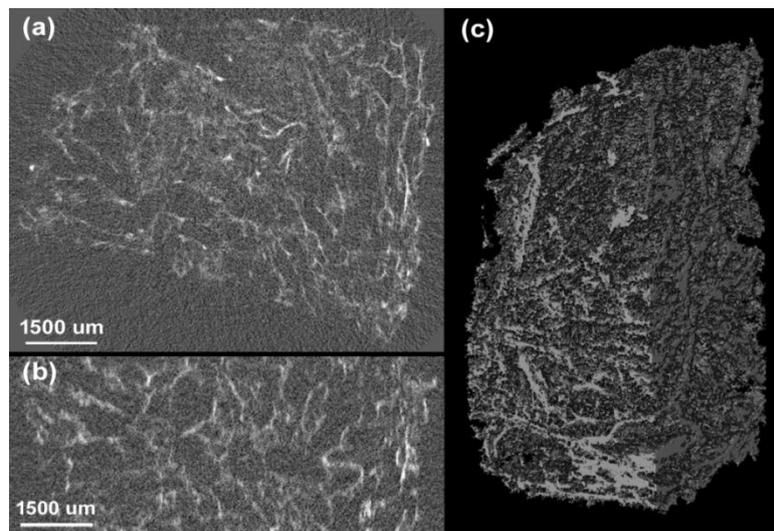


Figura 5.41: Imagens de microtomografia de raios-X do gel semi-IPN alginato/ quitosana e NFCT 50% (m/m) - seções transversais da amostra (a - b); volume da amostra exibindo arranjo de sua parede em 3D (c).

A partir da análise das Figuras 5.40 e 5.41 pode-se confirmar uma ampla distribuição do tamanho dos poros dos géis contendo CNCT ou NFCT (50% m/m). Assim como observado para os géis de alginato contendo CNCT (seção 5.2) aqui também, as amostras do gel semi-IPN alginato/ quitosana e CNCT (Alg_Qui_CNCT50) apresentaram poros orientados; neste caso, percebe-se uma orientação em espiral para as paredes dos poros, justificada pela presença da fase colestérica em nanocristais.

Além disso, o gel Alg_Qui_CNCT50 exibiu uma estrutura mais densa e com poros menores, quando comparada a do gel Alg_Qui_NFCT50. O gel de alginato, quitosana e NFCT (Alg_Qui_NFCT50) apresentou poros sem orientação preferencial e com uma distribuição dos tamanhos mais heterogênea (Figura 5.41).

Para avaliar quantitativamente a porosidade dos géis e a distribuição da espessura das paredes dos poros utilizou-se técnicas de processamento de imagem (Image J), semelhante ao descrito por Isaac *et al.* (2015). Os resultados estão apresentados na Figura 5.42 e revelaram valores de porosidade igual a 56% e 79% para os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (50% m/m) - gel Alg_Qui_CNCT50 e gel Alg_Qui_NFCT50, respectivamente.

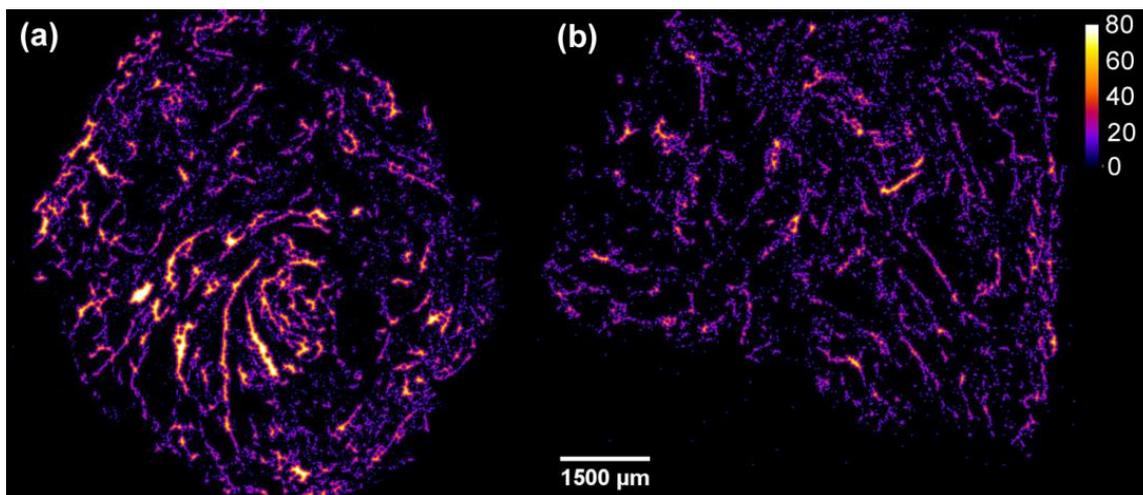


Figura 5.42: Mapas da espessura das paredes dos poros dos géis semi-IPNS alginato/ quitosana e CNCT 50% (m/m) (a); e alginato/ quitosana e NFCT 50% (m/m) (b). A legenda e a barra de escala estão em microns.

Tais resultados estão de acordo com os descritos na literatura para géis de alginato liofilizados e podem ser diretamente correlacionados com a permeabilidade (a gases, água ou outros fluidos biológicos) e com a resistência mecânica dos materiais. Além disso, as amostras do gel Alg_Qui_CNCT50 apresentaram uma distribuição muito heterogênea da espessura das paredes dos poros, entre 20 e 60µm (Figura 5.2a). As amostras do gel Alg_Qui_NFCT50 exibiram uma distribuição da espessura das paredes mais uniforme, com aproximadamente, 20µm, conforme apresentado na Figura 5.42b.

- ***Grau de inchamento***

O grau de inchamento de um gel está relacionado com a expansão da matriz polimérica que pode, conseqüentemente, modificar e/ou aumentar o tamanho dos seus poros. Quando o inchamento ocorre em excesso, o material tende a ficar mais flexível, podendo levar ao seu colapso (KAVYA *et al.*, 2013). Para aplicações biomédicas, a capacidade de absorção é também um parâmetro para avaliar o comportamento do material mediante os fluidos corporais e transmissão de nutrientes (LEE *et al.*, 2014).

Sabe-se que os géis físicos (sem reticulações químicas) não são permanentes e podem dissolver ou erodir quando as interações entre os polímeros se dissociam (TORRADO *et al.*, 2004). Além disso, a presença de uma maior quantidade de grupos carregados (negativamente, como $-\text{COO}^-$ presente nas cadeias de alginato e das nanoceluloses TEMPO-oxidadas, ou positivamente como $-\text{NH}_3^+$ das cadeias de quitosana solubilizada) no sistema polieletrólítico pode também influenciar a estabilidade física dos produtos formados (ABREU *et al.*, 2008).

Como um estudo preliminar, avaliou-se a estabilidade dimensional e a resistência à degradação dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (36% m/m) em condições fisiológicas (PBS pH 7,4, a 37°C), visando posteriores estudos de citotoxicidade e crescimento celular. Observou-se para o gel semi-IPN alginato/ quitosana sem adição de nanoceluloses (Alg_Qui) uma diminuição na massa das amostras hidratadas a partir de 2 horas de contato com a solução tampão (aproximadamente 22% de perda de massa); para os géis Alg_Qui_NFC36 e Alg_Qui_NFCT36, um tempo de

aproximadamente 24 horas foi necessário para que as amostras hidratadas começassem a perder massa (aproximadamente 4,5% de perda de massa). E, para os géis Alg_Qui_CNC36 e Alg_Qui_CNCT36 uma redução na massa das amostras hidratadas foi observada a partir de 48 horas em contato com a solução salina (aproximadamente 5,0% de perda de massa).

Sabendo que a hidratação dos géis ocorre até que a pressão osmótica do sistema se iguale às forças das suas bandas reticuladas (PASPARAKIS e BOUROPOULOS, 2006) e que a porosidade das amostras tem significativa influência no seu grau de hidratação, tal fato pode estar associado a uma maior separação entre as cadeias poliméricas a partir da adição de NFC/ NFCT. Como observado a partir das análises de microscopia das nanoceluloses e dos géis (imagens de MET e MEV, respectivamente), as nanofibras de celulose por serem mais longas e flexíveis e as NFCT, em especial, a partir da adição de grupos $-\text{COO}^-$ ao sistema, podem contribuir para a maior separação da rede interpolimérica em pH 7,4. Ao longo dos 21 dias de análise o gel Alg_Qui (sem adição de nanocelulose) perdeu a sua forma e se desintegrou no meio; tal comportamento não foi observado para as amostras dos géis contendo nanoceluloses, confirmando a participação das mesmas na estabilidade dimensional dos géis.

Então, para estudar propriedades físico-químicas dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses e obter o tempo necessário para se alcançar o equilíbrio de hidratação dos géis, fez-se um estudo da cinética de inchamento utilizando-se o gel Alg_Qui_CNC36, em PBS, pH 7,4, a 25°C e 37°C (Figura 5.43). A escolha de tal amostra baseou-se na morfologia, aspectos macroscópicos e parâmetros físico-químicos obtidos a partir dos ensaios preliminares de absorção e perda de massa.

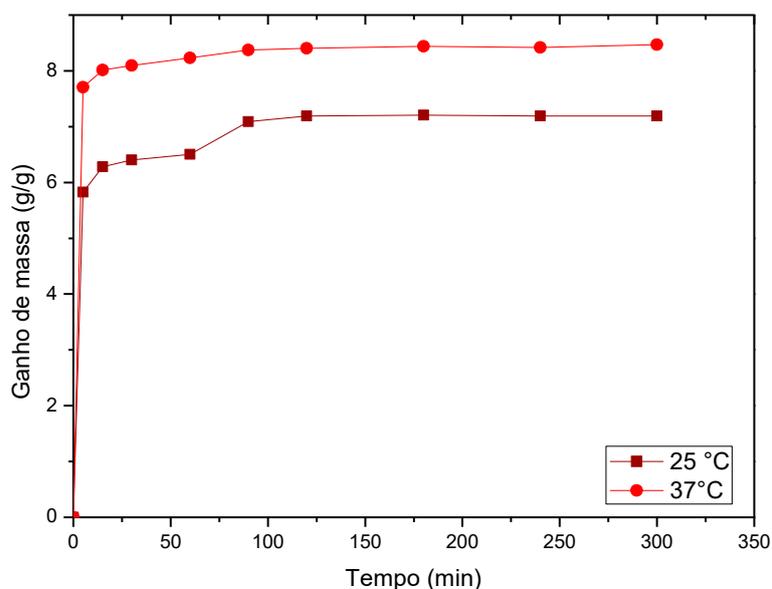


Figura 5.43: Ganho de massa do gel semi-IPN alginato/ quitosana e nanocelulose (36% m/m) (Alg_Qui_CNC36) em função do tempo, em PBS, pH 7,4, a 25°C e 37°C.

A partir da análise da Figura 5.43, determinou-se o tempo de equilíbrio para os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses: foram necessárias, aproximadamente, 2 horas para se obter um ganho de massa máximo e constante, nas condições analisadas (8,3g/g, à 37°C e 7,0g/g à 25°C). Observou-se que, após os primeiros 15 minutos de análise, 80% do ganho máximo de massa das amostras avaliadas já havia sido atingido para os ensaios realizados a 25°C e 90% do ganho de massa máximo para aqueles realizados a 37°C. A interação eletrostática entre as cadeias poliméricas de complexos poliônicos liofilizados facilita a interação matriz-solvente e permite um inchamento rápido e eficiente (TORRADO *et al.*, 2004). Uma pequena variação no grau de inchamento em função do aumento da temperatura pode ser justificada pela presença dos grupos hidrofílicos presentes nas cadeias dos polímeros constituintes dos géis: alginato, quitosana e nanoceluloses. Em maiores temperaturas, as interações polímero-água são favorecidas (QUEIROZ, 2010).

Portanto, os ensaios de inchamento máximo para os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses foram realizados em um intervalo de tempo igual a 2 horas, em H₂O milli-Q (pH 6,2 a

37°C) e em condições fisiológicas (tampão fosfato pH 7,4 a 37°C). Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela V.6.

Tabela V.6: Ganho de massa máximo após ensaio de inchamento (2h; 37°C em água milli-Q e em PBS, pH 7,4) para os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses.

AMOSTRA	Ganho de massa (g/g) Água milli-Q; pH6,2	Ganho de massa (g/g) PBS; pH7,4
Alg_ Qui	9,53 ± 0,43	9,49 ± 0,55
Alg_ Qui_ CNC10	8,73 ± 0,30	8,94 ± 0,20
Alg_ Qui_ CNC36	7,86 ± 0,06	8,22 ± 0,45
Alg_ Qui_ CNC50	7,17 ± 0,29	6,99 ± 0,05
Alg_ Qui_ CNCT10	6,77 ± 0,42	7,36 ± 0,41
Alg_ Qui_ CNCT36	7,84 ± 0,11	7,81 ± 0,06
Alg_ Qui_ CNCT50	7,56 ± 0,56	6,99 ± 0,25
Alg_ Qui_ NFC10	8,32 ± 0,59	7,71 ± 0,45
Alg_ Qui_ NFC36	8,84 ± 0,60	8,48 ± 0,09
Alg_ Qui_ NFC50	13,25 ± 0,52	12,46 ± 0,59
Alg_ Qui_ NFCT10	7,96 ± 0,17	7,20 ± 0,12
Alg_ Qui_ NFCT36	8,77 ± 0,25	9,70 ± 0,48
Alg_ Qui_ NFCT50	12,26 ± 0,71	11,38 ± 0,52

Pela análise da Tabela V. 6 pode-se observar, a maior influência das NFC/ NFCT (50% m/m) no grau de inchamento dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses, nas condições analisadas (PBS pH 7,4 e água milli-Q). Um inchamento máximo de, aproximadamente, 12g/g foi encontrado para amostras contendo 50% (m/m) de nanofibras de celulose (Alg_ Qui_ NFC50;

Alg_Qui_NFCT50). Tal fato pode ser justificado também pela participação das NFC/ NFCT na formação de redes interconectadas entre as cadeias de alginato e quitosana, conferindo ao material uma maior porosidade, com conseqüente influência nas propriedades físico-químicas dos géis.

Observou-se um inchamento máximo de, aproximadamente, 8,5g/g para os demais géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses. Justifica-se o inchamento dos géis pela natureza porosa do sistema polieletrólítico alginato/ quitosana obtido por liofilização e à presença de grupos hidrofílicos nas cadeias dos polímeros avaliados (alginato, quitosana e nanoceluloses).

Para conhecer o comportamento do sistema polieletrólítico em estudo (géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses), em diferentes valores de pH, visando possíveis aplicações biomédicas e/ ou farmacêuticas, alguns ensaios de inchamento também foram realizados em outras soluções tampão de fosfato, com valores de pH 3 e 9, à 37°C. Os resultados encontrados para os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses 36% (m/m) estão apresentados na Figura 5.44.

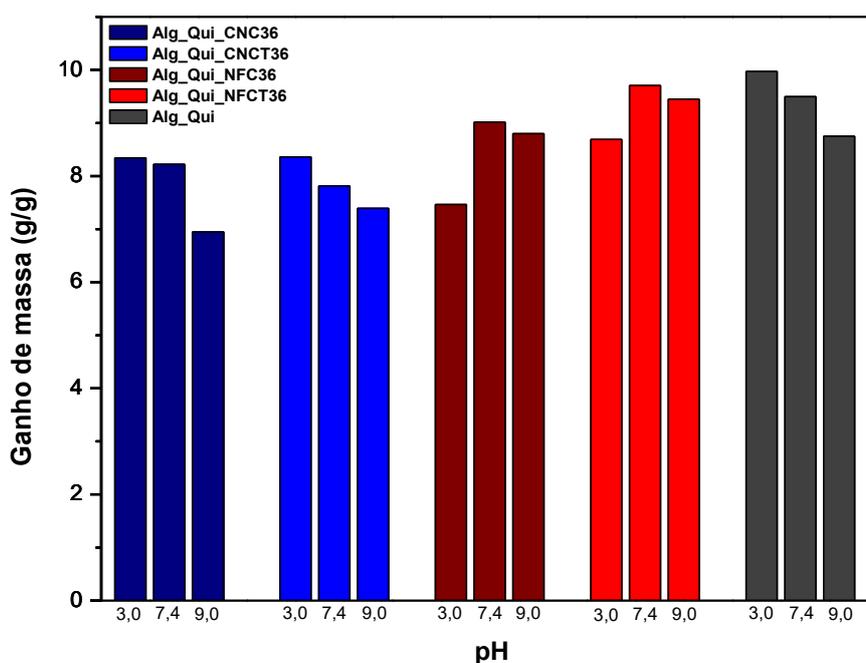


Figura 5.44: Grau de inchamento dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses 36% (m/m): Alg_Qui_CNC36; Alg_Qui_CNCT36; Alg_Qui_NFC36; Alg_Qui_NFCT36; Alg_Qui, em diferentes valores de pH.

De maneira geral, géis de alginato e quitosana são sensíveis a alterações de pH do meio (ABREU *et al.*, 2008), em função da protonação/ desprotonação dos grupos carboxilatos das cadeias de alginato e dos grupos amino da quitosana. Para aplicações biomédicas, compreender o comportamento de um *scaffold* durante o inchamento é de suma importância, uma vez que este é dependente do pH do local de implantação (LI *et al.*, 2005). A Figura 5.45 representa, esquematicamente, a influência do pH do meio na estrutura e, conseqüentemente, no inchamento de géis semi-IPNs de alginato e quitosana.

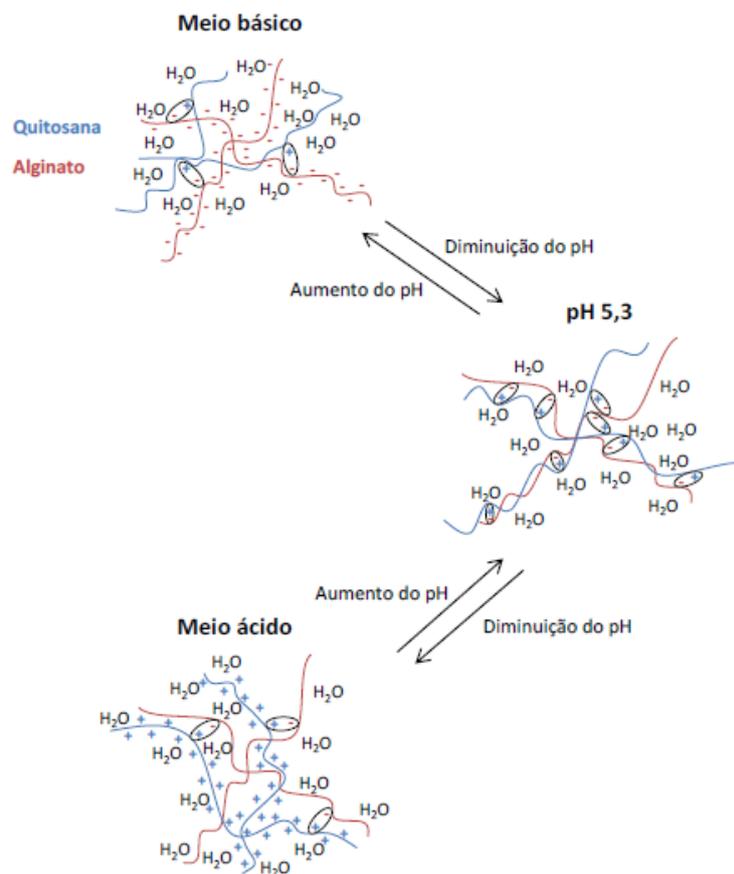


Figura 5.45: Efeito do pH na estrutura e no grau de inchamento de géis semi-IPN quitosana e alginato. Os círculos representam as interações iônicas entre as cargas negativas (-) do alginato e as cargas positivas da quitosana (+). (Adaptado - BERGER *et al.*, 2004).

No presente trabalho, os ensaios de inchamento em valores distintos de pH contribuíram para a compreensão do comportamento físico-químico deste sistema polieletrólítico (alginato/ quitosana) com diferentes tipos de nanoceluloses. Um inchamento máximo (de, aproximadamente 10g/g) foi encontrado para os géis Alg_Qui_NFCT36, em pH 7,4. Em pH próximo da neutralidade, sugere-se que as cadeias poliméricas de cargas oposta (alginato e NFCT, com grupos carboxilatos e a quitosana com grupos amino protonados) permanecem emaranhadas e unidas pela atração eletrostática (BERGER *et al.*, 2004), facilitando o inchamento.

Em pH 3,0, tem-se a protonação dos grupos $-\text{COO}^-$ e o inchamento do gel resulta da expansão das cadeias de quitosana protonadas, devido à repulsão das cargas positivas presentes no meio ácido (inchamento máximo de 7,5g/g para o gel Alg_Qui_NFC36 e de 8,7g/g para o gel Alg_Qui_NFCT36).

Em pH 9,0, um maior número de grupos $-\text{COO}^-$ encontram-se desprotonados e as cadeias de alginato e NFCT tendem a expandir, garantindo o inchamento do gel. Não foram observadas perdas de massa dos materiais durante as 2 horas de ensaio nos diferentes meios (pH 3,0; 7,4 ou 9,0). Esse fenômeno reforça a participação das NFC/ NFCT na reticulação dos géis e formação de uma rede polimérica com as cadeias de alginato e quitosana.

Os géis Alg_Qui_CNC36 e Alg_Qui_CNCT36 apresentaram um comportamento semelhante entre si, podendo-se observar os maiores valores de inchamento em pH 3,0 e 7,4 (aproximadamente, 8,0g/g). O inchamento é consequência, principalmente, da atração eletrostática entre as cadeias de alginato e quitosana em pH 7,4 e da expansão das cadeias de quitosana protonadas em pH 3,0. Em meio básico (pH 9,0) tem-se a expansão das cadeias de alginato e, conseqüentemente, o inchamento dos géis.

Porém, uma menor estabilidade dimensional pode ser observada para as amostras dos géis Alg_Qui_CNC36 e Alg_Qui_CNCT36 em pH alcalino: as amostras começaram a degradar nas primeiras 2 horas de contato com a solução fosfato pH 9,0 (tempo inferior ao encontrado para os ensaios realizados em pH 3,0 e 7,4) e menores valores de massa foram registrados. Tal fato pode ser justificado pelo maior número de grupos $-\text{COO}^-$ desprotonados em pH 9,0, expansão das cadeias de

alginate, contração das cadeias de quitosana, somada ao efeito quelante dos íons fosfato com os íons Ca^{2+} (reticuladores físicos das cadeias de alginate).

Para o gel semi-IPN alginate/ quitosana sem adição de nanoceluloses (Alg_Qui) um inchamento máximo de 10,0g/g foi encontrado em pH 3,0. Porém, as amostras começaram a degradar a partir de, aproximadamente, 2 horas de ensaio, independentemente do pH do meio. Destaca-se, portanto a contribuição das nanoceluloses, também, na estabilidade dimensional dos géis semi-IPNs alginate/ quitosana e nanoceluloses, principalmente em condições fisiológicas e em meio ácido (próximo ao pKa do alginate - 3,38 e 3,65). A interação eletrostática dos grupos amino da quitosana com grupos carboxilatos disponíveis (alginate e nanoceluloses TEMPO-oxidadas) tende a dificultar a protonação da quitosana e os grupos ácido carboxílico disponíveis tamponam a solução, retardando a degradação do material (LI *et al.*, 2005).

Tal fato permite que esses novos materiais desenvolvidos sejam potencialmente aplicáveis em uma gama mais ampla de situações clínicas.

- ***Análises Termomecânicas (TMA)***

Géis poliméricos biodegradáveis, utilizados como matrizes celulares em engenharia de tecidos, podem ser utilizados como *scaffolds* para o cultivo de células (BOATENG *et al.*, 2008), como curativos auxiliando na cicatrização de feridas, dentre outros. Para tanto, devem possuir uma estrutura tridimensional, com grande área superficial, adequada à adesão, migração e crescimento celular. As propriedades mecânicas também são características importantes e devem ser similares às do tecido lesionado; a taxa de degradação, em algumas de suas aplicações, deve ser preferencialmente próxima à taxa de regeneração do tecido (KHAN e AHMAD, 2013).

Para avaliar a influência dos diferentes tipos de nanoceluloses (CNC, CNCT, NFC e NFCT) nas propriedades mecânicas dos géis semi-IPNs alginate/ quitosana, análises termomecânicas foram realizadas para as amostras dos géis contendo nanoceluloses (36 e 50% m/m). Ressalta-se, novamente, que as amostras contendo 10% (m/m) de nanoceluloses não foram analisadas por TMA

em função da sua heterogeneidade, menor estabilidade dimensional e demais características físico-químicas já avaliadas ao longo deste estudo. A análise termomecânica (TMA) é uma técnica que permite estudar as propriedades dos materiais em função da variação da temperatura. Através dela, mede-se as propriedades intrínsecas do material, como coeficiente de expansão, transição vítrea, dentre outros. O processo consiste em medir as variações dimensionais da amostra (em função da temperatura) ao mesmo tempo em que é solicitada mecanicamente. Neste processo podem ser aplicados diversos tipos de carregamento, como tração, flexão, penetração ou compressão, utilizada no presente estudo.

A Figura 5.46 apresenta as temperaturas de transição vítrea (T_g) para os géis semi-IPNs alginato/quitosana sem nanoceluloses (Alg_Qui) e para os géis semi-IPNs alginato/quitosana e nanoceluloses, após os dois ciclos de aquecimento. Durante as análises, com o aumento da temperatura do sistema, tem-se a movimentação das cadeias poliméricas. Pode-se avaliar o comportamento de fluência e relaxamento das cadeias e a temperatura de transição vítrea das amostras. A partir da análise da Figura 5.46a pode-se observar que a T_g do gel Alg_Qui, no primeiro ciclo de aquecimento, aparece próxima a 72°C , temperatura superior à T_g do alginato reticulado com cálcio (47°C) e à T_g da quitosana pura (aproximadamente, 65°C - Figura X.1 do Apêndice). Sabendo que a T_g de um material é maior quando se tem um aumento das interações intermoleculares secundárias (BARBANI *et al.*, 2005) pode-se confirmar as interações entre os polieletrólitos alginato e quitosana nas condições adotadas no presente estudo. Após um segundo ciclo de aquecimento, nenhuma transição pode ser verificada para as condições de análise selecionadas.

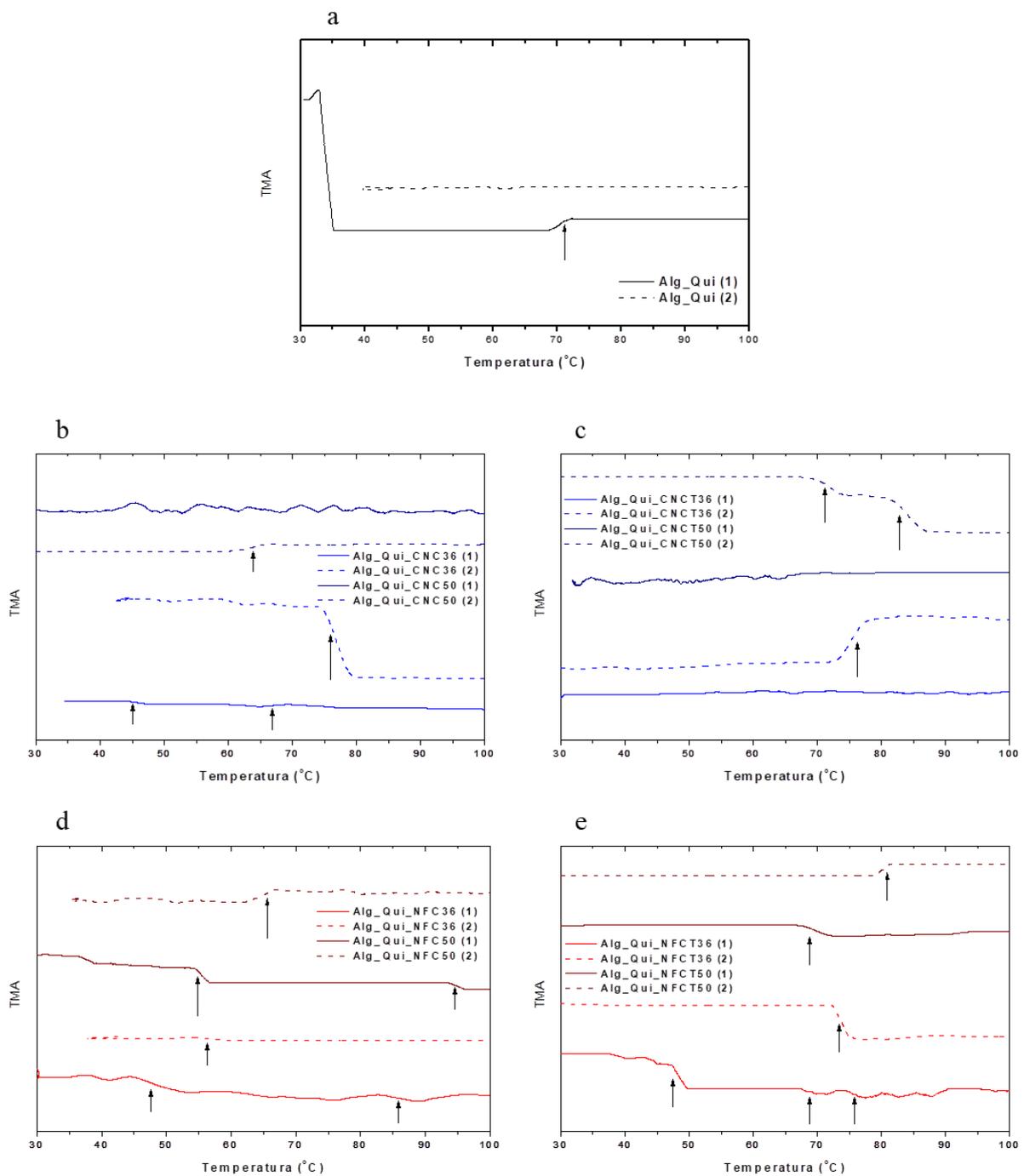


Figura 5.46: Análise de TMA para os géis semi-IPNs alginato/ quitosana sem adição de nanoceluloses (a) e para os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (36 e 50% m/m) (b-e) – Temperatura de transição vítrea em dois ciclos de aquecimento, sendo (1) para o primeiro ciclo e (2) para o segundo ciclo de aquecimento.

A Figura 5.46 (b-e) apresenta as curvas obtidas a partir das análises de TMA para os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (36 e 50% m/m), após 2 ciclos de aquecimento. Para todas as amostras pode-se verificar, principalmente durante o primeiro ciclo de aquecimento, mais de uma temperatura de transição vítrea, resultado da complexidade do sistema e das diferentes interações possíveis entre as cadeias poliméricas (alginato, quitosana e nanoceluloses).

Porém, após um segundo ciclo de aquecimento, pode-se observar um menor número de transições, com deslocamento das Tg's para valores superiores aos observados durante o primeiro ciclo de aquecimento. Tal fato pode ser um indicativo de que as cadeias poliméricas de um dos componentes da mistura estão afetando a mobilidade das demais, suggestionando uma miscibilidade parcial. Com o aumento da temperatura, tem-se a eliminação do efeito plastificante da água absorvida pelos géis. Além disso, as cadeias sofrem relaxações e se aproximam. Aumentam as interações iônicas entre os polieletrólitos (alginato e quitosana), entre os grupos $-\text{COO}^-$ do alginato e das nanoceluloses TEMPO-oxidadas e íons Ca^{2+} livres na estrutura, além das demais interações secundárias entre as cadeias de alginato, quitosana e nanoceluloses. O material se torna mais rígido e mais homogêneo.

Pode-se verificar também, a partir da análise da Figura 5.46, que a variação da concentração das nanoceluloses (36 ou 50% m/m) nos géis IPNs_alginato/ quitosana e nanoceluloses exerceu pouca influência sobre as análises de TMA, sendo mais um indício de que seja esta (36 - 50%) a faixa de concentração ótima para as nanoceluloses no sistema em estudo. Quando se compara os valores de Tg para as amostras dos géis contendo nanoceluloses sem modificação química e nanoceluloses TEMPO-oxidadas, aqui também se percebe um ligeiro deslocamento das Tg's para valores superiores quando se utiliza CNCT ou NFCT (aproximadamente, 80°C). Tal fato corrobora para a possibilidade de uma reticulação iônica adicional, termicamente induzida, entre os íons Ca^{2+} e os grupos carboxílicos disponíveis na estrutura e/ ou entre as cadeias de quitosana e os grupos $-\text{COO}^-$.

Para uma melhor compreensão do comportamento mecânico dos géis apresentados nesta seção, visando possíveis aplicações em engenharia de tecidos, análises termodinâmico-mecânicas (DMTA) foram realizadas para amostras dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (50% m/m).

- **Análise Termodinâmico-Mecânica (Dynamic Mechanical Thermal Analyses - DMTA)**

Géis de polímeros naturais, biocompatíveis e porosos, apesar de fornecerem um microambiente adequado para adesão, proliferação e migração das células (necessário para a regeneração de tecidos) muitas vezes apresentam limitações para aplicações biomédicas em função das baixas propriedades mecânicas apresentadas (KUMAR *et al.*, 2017).

Análises termodinâmico-mecânicas dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (50% m/m) foram realizadas a fim de correlacionar as propriedades macroscópicas dos géis às relaxações moleculares termicamente induzidas e interações físico-químicas presentes nos materiais. Avaliou-se a variação no módulo de armazenamento (E') das amostras (Alg_QUI_CNC50, Alg_QUI_CNCT50, Alg_QUI_NFC50 e Alg_QUI_NFCT50) em função do aumento da temperatura, em dois ciclos de aquecimento e denominou-se E'_1 o módulo de armazenamento após o primeiro ciclo de aquecimento e E'_2 o módulo de armazenamento após o segundo ciclo de aquecimento. A Tabela V.7 apresenta os valores de módulo de armazenamento obtidos para as amostras dos géis, em valores de temperaturas específicas (35, 37 e 42°C, visando aplicações biomédicas), nos dois ciclos de aquecimento.

Tabela V.7: Módulo de armazenamento (E'_1 e E'_2) dos géis Alg_QUI (sem adição de nanoceluloses) e Alg_QUI_CNC50, Alg_QUI_CNCT50, Alg_QUI_NFC50, Alg_QUI_NFCT50, na faixa de temperatura corporal (35, 37 e 42°C).

GEL	35°C		37°C		42°C	
	E'_1 (MPa)	E'_2 (MPa)	E'_1 (MPa)	E'_2 (MPa)	E'_1 (MPa)	E'_2 (MPa)
Alg_QUI	0,08	4,50	0,07	6,00	0,07	8,50
Alg_QUI_CNC50	0,10	6,88	0,11	7,37	0,11	8,60
Alg_QUI_CNCT50	0,10	7,50	0,11	8,10	0,11	9,95
Alg_QUI_NFC50	0,05	1,25	0,05	1,80	0,05	6,03
Alg_QUI_NFCT50	0,09	6,88	0,10	7,37	0,10	8,50

Para todas as amostras avaliadas, durante o primeiro ciclo de aquecimento, não foram verificadas variações nos valores de E' (nas temperaturas selecionadas) o que pode ser justificado pela menor mobilidade das cadeias poliméricas em temperaturas abaixo das T_g 's dos géis (verificadas a partir de 50°C). Após um segundo ciclo de aquecimento, houve um aumento significativo nos módulos de armazenamento (E'_2) justificado por uma reorganização microestrutural das cadeias poliméricas que sofrem relaxações e se aproximam. Consequentemente, tem-se reticulação iônica adicional entre os íons Ca^{2+} e os grupos $-\text{COO}^-$ disponíveis nos sistemas, reticulação iônica adicional entre os polieletrólitos alginato e quitosana, entre a quitosana e as cadeias de nanoceluloses TEMPO-oxidadas, além das interações secundárias, do tipo ligação de hidrogênio, favorecidas entre as cadeias dos polímeros alginato, quitosana e nanoceluloses. Os resultados obtidos a partir das análises de DMTA corroboram com aqueles encontrados para as análises de TMA.

A Figura 5.47 apresenta a variação nos módulos de armazenamento dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanocelulose 50% (m/m), durante um segundo ciclo de aquecimento.

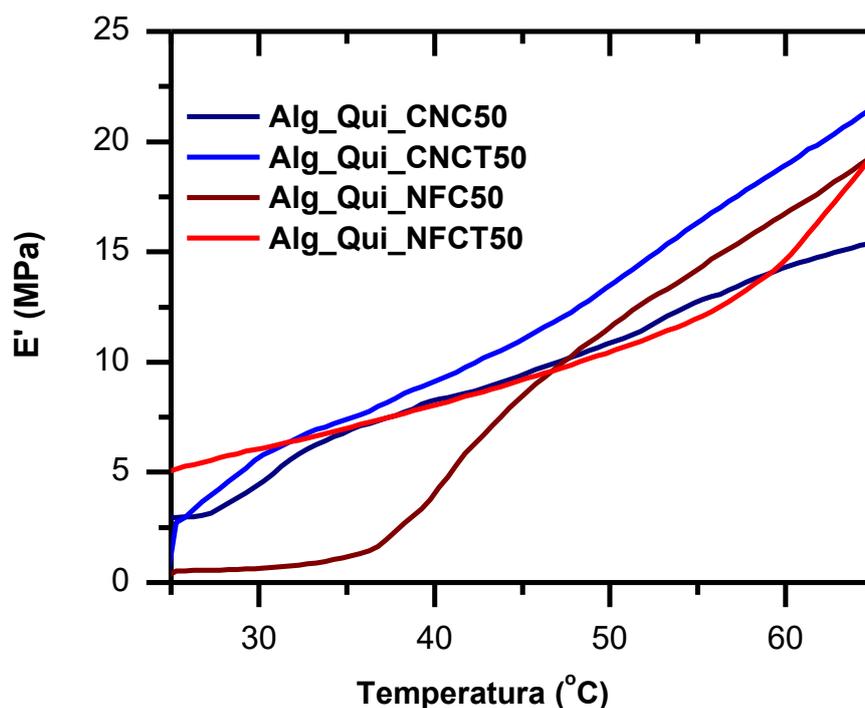


Figura 5.47: Módulo de armazenamento (E'_2) dos géis Alg_Qui_CNC50, Alg_Qui_CNCT50, Alg_Qui_NFC50 e Alg_Qui_NFCT50 em um segundo ciclo de aquecimento.

Assim como observado para os géis de alginato e nanoceluloses (seção 5.2 do presente estudo), aqui também pode-se observar melhorias significativas nas propriedades mecânicas dos géis a partir da adição das nanoceluloses, em um segundo ciclo de aquecimento, com exceção das NFC. Um comportamento diferenciado para as NFC (quando comparadas às demais nanoceluloses adicionadas aos sistemas) pode ser justificado pela menor dispersão das mesmas na matriz de alginato e quitosana: as interações cadeia-cadeia são favorecidas em função da própria morfologia das fibras e da quantidade de NFC utilizada (50% m/m) na preparação dos géis. Segundo Nordli *et al.* (2016) e Lin *et al.* (2012), as nanofibras, mais longas e flexíveis, exercem uma maior influência na porosidade e nas propriedades biológicas dos materiais.

Entretanto, os géis preparados com NFCT (50% m/m) apresentaram valores de E' semelhantes àqueles contendo CNC/ CNCT. Acredita-se que os grupos carboxílicos introduzidos ao sistema, a partir da adição das NFCT, facilitaram a dispersão das mesmas e contribuíram para uma reticulação iônica adicional, termicamente induzida, seja com íons Ca^{2+} (CHINGA-CARRASCO, 2018; BASU *et al.*, 2017) e/ ou com os grupos $-NH_3^+$ da quitosana protonada. Justifica-se, portanto, a participação mais efetiva das nanofibras TEMPO-oxidadas na microestrutura dos géis de alginato e quitosana, o que favoreceu a interação entre as cadeias poliméricas, com consequente melhoria nas propriedades físico-químicas e mecânicas dos mesmos.

A partir dos resultados obtidos através das análises de DMTA e demais análises realizadas ao longo deste estudo, selecionou-se amostras dos géis Alg_Qui_NFCT50 e Alg_Qui_CNCT50 para os ensaios de citotoxicidade e crescimento celular. Visando materiais mais homogêneos e com propriedades mecânicas melhoradas, as amostras foram previamente aquecidas em estufa, a 80°C, por 4h. Os géis Alg_Qui_NFCT50 e Alg_Qui_CNCT50, principalmente em função dos grupos carboxílicos presentes na superfície das nanoceluloses TEMPO-oxidadas, apresentaram propriedades mecânicas e estabilidade dimensional promissoras para possíveis aplicações em engenharia de tecidos. Além disso, Klemm *et al.* (2011), Lin e Dufresne (2014) e Chinga-Carrasco (2018) destacam em seus trabalhos a importância de se combinar as nanoceluloses a outros polímeros na preparação de materiais para a medicina regenerativa e cicatrização de feridas.

- ***Ensaio de Citotoxicidade e crescimento celular***

Para aplicações biomédicas em engenharia de tecidos ou para tratamentos de lesões da pele, por exemplo, faz-se necessário o desenvolvimento de materiais que combinem propriedades mecânicas e biológicas semelhantes ao tecido vivo. Materiais que sejam capazes de auxiliar a cicatrização, prevenir infecções, manter um ambiente adequado à formação do novo tecido, dentre outros.

Os ensaios de citotoxicidade e crescimento celular foram realizados a fim de avaliar o potencial dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses como materiais biocompatíveis e demonstrar a interação célula-material, visando aplicações em engenharia de tecidos. Em função das características físico-químicas, mecânicas e morfológicas, avaliadas ao longo deste trabalho, as amostras dos géis contendo 50% (m/m) de nanoceluloses TEMPO-oxidadas (Alg_Qui_CNCT50 e Alg_Qui_NFCT50) foram selecionadas. Para efeitos comparativos, os mesmos ensaios foram realizados com o gel semi-IPN alginato/ quitosana sem nanoceluloses (Alg_Qui).

De maneira semelhante aos ensaios realizados com os géis de alginato e nanoceluloses (seção 5.2 do presente estudo) aqui também avaliou-se a citotoxicidade das amostras pelo teste MTT, tanto pelo método do contato direto das células de fibroblastos L929 com os géis, quanto pelo método do contato indireto (ou método do eluato). A Figura 5.48 apresenta a viabilidade das células após 24, 48, 72 e 96 horas de contato direto com os géis semi-IPNs Alg_Qui, Alg_Qui_CNCT50 e Alg_Qui_NFCT50. Ressalta-se, novamente, que para a avaliação dos testes de biocompatibilidade, incluindo citotoxicidade *in vitro*, adotou-se os seguintes critérios, segundo ISO10993-5 (2009), medidos com base na viabilidade celular do controle:

- Amostra não citotóxica: viabilidade celular > 90%;
- Amostra levemente citotóxica: viabilidade celular entre 60 e 90%;
- Amostra moderadamente citotóxica: viabilidade celular de 30 a 59%;
- Amostra severamente citotóxica: viabilidade celular \leq 30%.

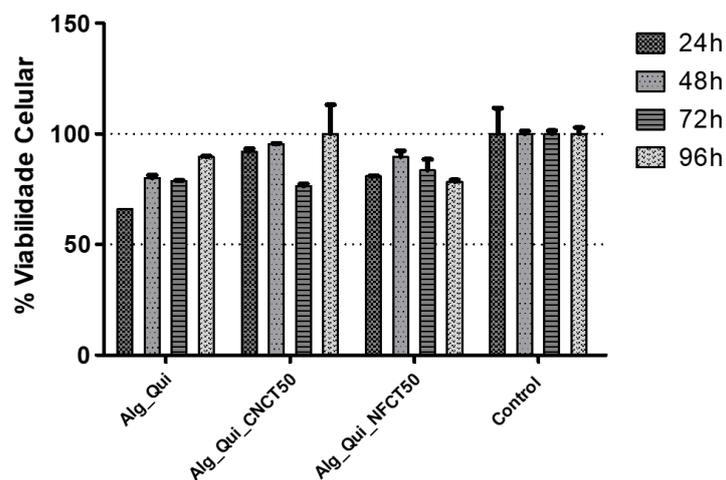


Figura 5.48: Ensaio MTT de fibroblastos L929 semeados no gel semi-IPN alginato/ quitosana (Alg_Qui) e nos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (50% m/m) (Alg_Qui_CNCT50 e Alg_Qui_NFCT50). Ensaio do contato direto - citotoxicidade e proliferação celular avaliadas após 24, 48, 72 e 96 horas. Os dados representam a média \pm desvio padrão de seis repetições para cada material (n = 6).

A partir dos resultados obtidos pelos ensaios de citotoxicidade, realizados pelo contato direto das células de fibroblastos L929 com os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e alginato/quitosana e nanoceluloses (Figura 5.47), pode-se observar para as amostras dos géis Alg_Qui e Alg_Qui_NFCT50 um efeito ligeiramente citotóxico, com viabilidade celular entre 60 e 90%; para o gel Alg_Qui_CNCT50 um efeito não citotóxico foi encontrado, com viabilidade celular $>$ 90%, sugerindo uma melhor citocompatibilidade com as células de fibroblastos L929.

Ressalta-se também uma menor viabilidade celular para os géis Alg_Qui e Alg_Qui_NFCT50 nas primeiras 24 horas em contato direto com as células de fibroblastos L929 e, após 48 horas, para o gel Alg_Qui_CNCT50. Tal comportamento pode estar associado ao inchamento dos géis com o meio de cultura que induz uma diminuição de nutrientes disponíveis para o crescimento celular e, conseqüentemente, perdas na viabilidade das células (NWE *et al.*, 2010).

No entanto, nas análises realizadas em intervalos de tempos posteriores aos mencionados (24/ 48h), pode-se observar novamente a proliferação das células que reestabelecem contato com o gel (hidratado) e com o meio de cultura. Tudo isso, associado à natureza dos polímeros alginato e quitosana que oferecem, dentre várias vantagens, propriedades antimicrobianas (DAN *et al.*, 2016), favoreceram o crescimento e a proliferação celular.

Pode-se observar também que o crescimento das células permaneceu estável, dentro do tempo de cultura analisado, para todas as amostras dos géis. A população de células na superfície do material é maior nos géis contendo 50% (m/m) de nanoceluloses Alg_Qui_CNCT50 e Alg_Qui_NFCT50, especialmente para o gel contendo CNCT (50% m/m), quando comparados ao gel semi_IPN alginato/ quitosana puro (Alg_Qui). A adição de CNCT ou NFCT (50% m/m) aos géis semi-IPNs alginato/ quitosana contribuiu para a fixação, espalhamento e crescimento das células de fibroblastos nos novos materiais. Assim, a partir da exposição direta dos biomateriais às células cultivadas, pode-se simular condições *in vivo* de interações diretas das células hospedeiras com os novos biomateriais.

Para aplicações biomédicas, o *scaffold* também deve se degradar em componentes não-tóxicos que possam ser eliminados ou reabsorvidos pelo organismo (KHAN e AHMAD, 2013). Realizou-se, portanto, o ensaio do contato indireto (teste de eluição) dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (50% m/m) com células de fibroblastos L929, a fim de se avaliar os efeitos de possíveis contaminantes tóxicos que podem ser facilmente extraídos dos biomateriais. Os resultados estão apresentados na Figura 5.49.

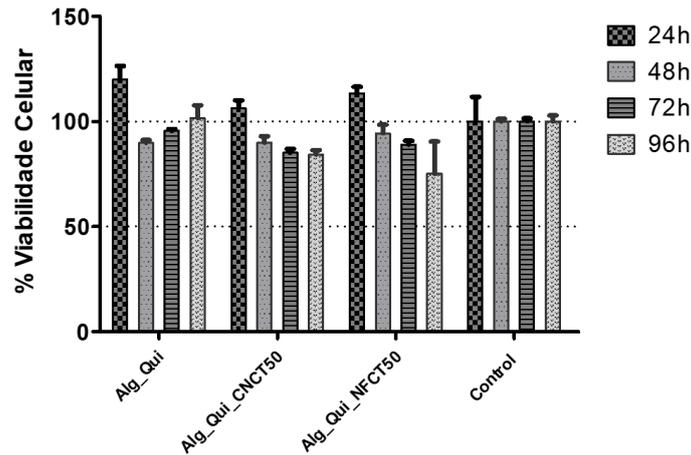


Figura 5.49: Ensaio MTT de fibroblastos L929 semeados no gel semi-IPN alginato/ quitosana (Alg_Qui) e nos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses (50% m/m) (Alg_Qui_CNCT50 e Alg_Qui_NFCT50). Ensaio do contato indireto (eluato por 48h) citotoxicidade e proliferação celular avaliadas após 24, 48, 72 e 96 horas. Os dados representam a média \pm desvio padrão de seis repetições para cada material (n = 6).

A partir dos resultados de viabilidade celular pelo método indireto (viabilidade entre 75 e 98%) pode-se constatar um efeito não citotóxico e um excelente perfil de citocompatibilidade para todos os géis semi IPNs alginato/ quitosana e alginato/ quitosana e nanoceluloses (50% m/m) analisados.

A caracterização morfológica e microestrutural dos fibroblastos L929, semeados nos géis Alg_Qui, Alg_Qui_CNCT50 e Alg_Qui_NFCT50, após 2, 4 e 7 dias de cultura, foi realizada através da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras. Avaliou-se também as possíveis interações célula-material e as imagens estão apresentadas nas Figuras 5.50 (para o gel Alg_Qui), 5.51 (para o gel Alg_Qui_CNCT50) e 5.52 (para o gel Alg_Qui_NFCT50).

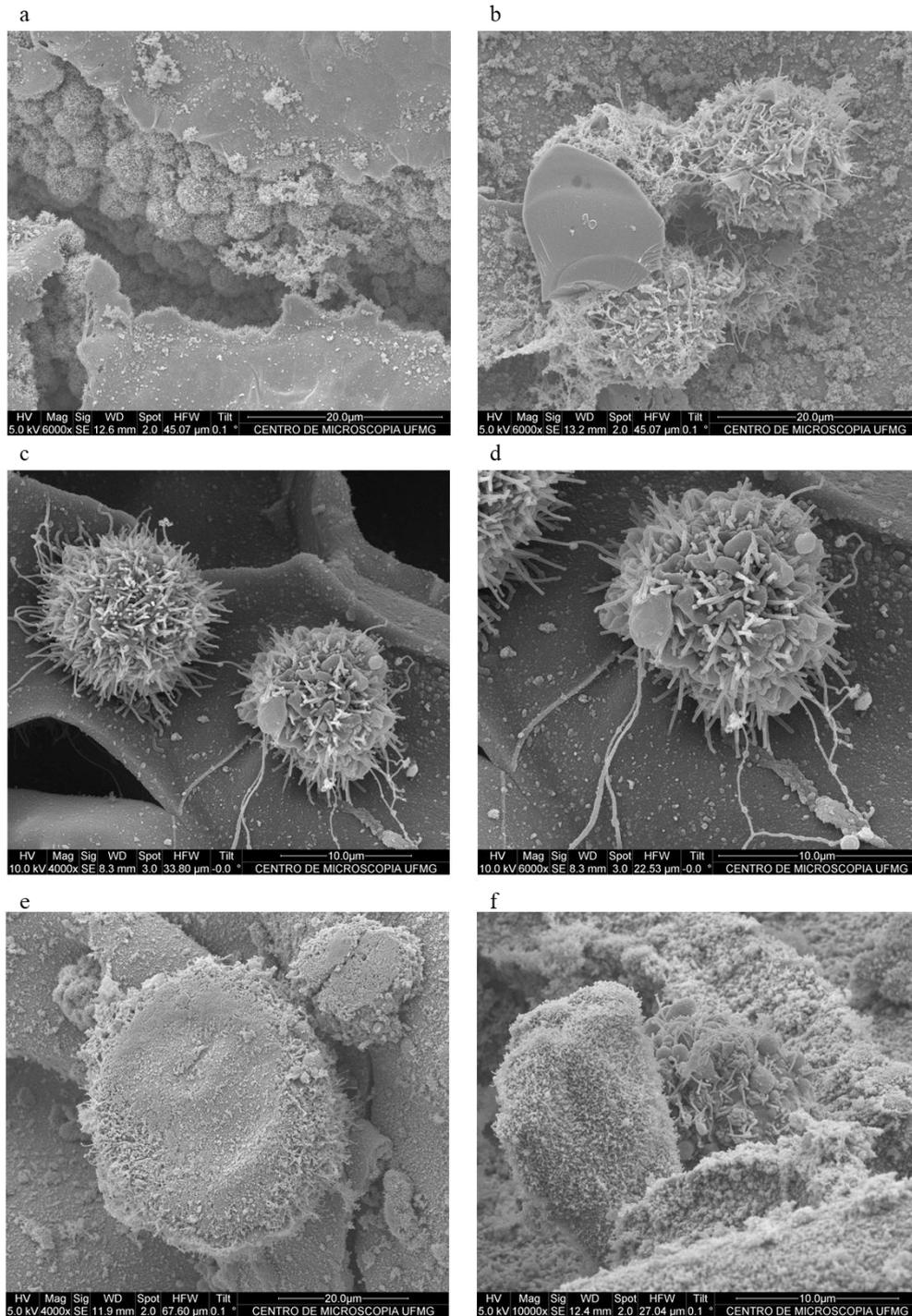


Figura 5.50. Micrografias MEV de células de fibroblastos L929 semeadas no gel semi-IPN alginato/quitosana (Alg_Qui) após 2 dias de incubação (a-b), 4 dias de incubação (c-d) e 7 dias de incubação (e-f).

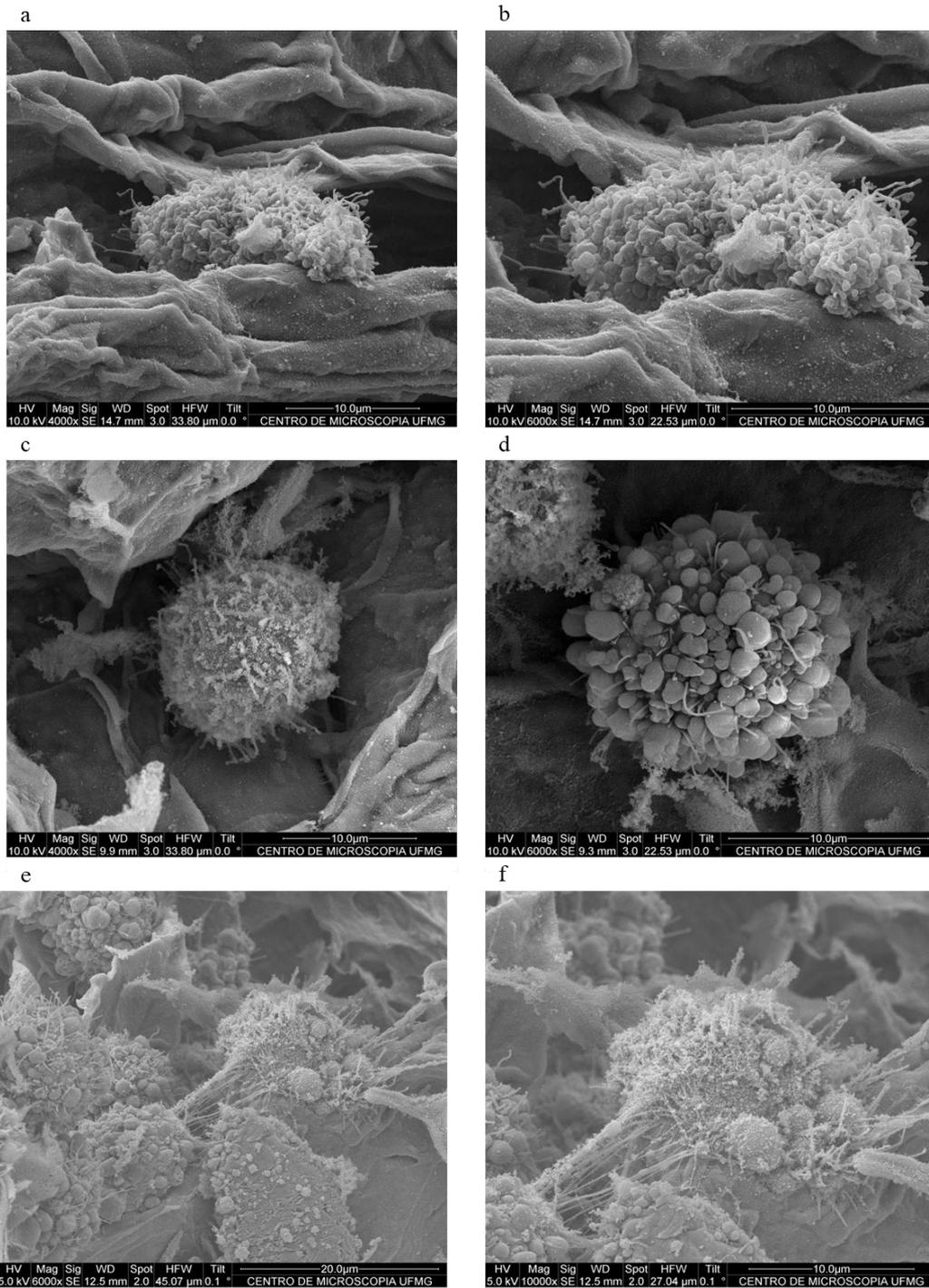


Figura 5.51. Micrografias MEV de células de fibroblastos L929 semeadas no gel semi-IPN alginato/ quitosana e CNCT (50% m/m) – Alg_Qui_CNCT50 após 2 dias de incubação (a-b), 4 dias de incubação (c-d) e 7 dias de incubação (e-f).

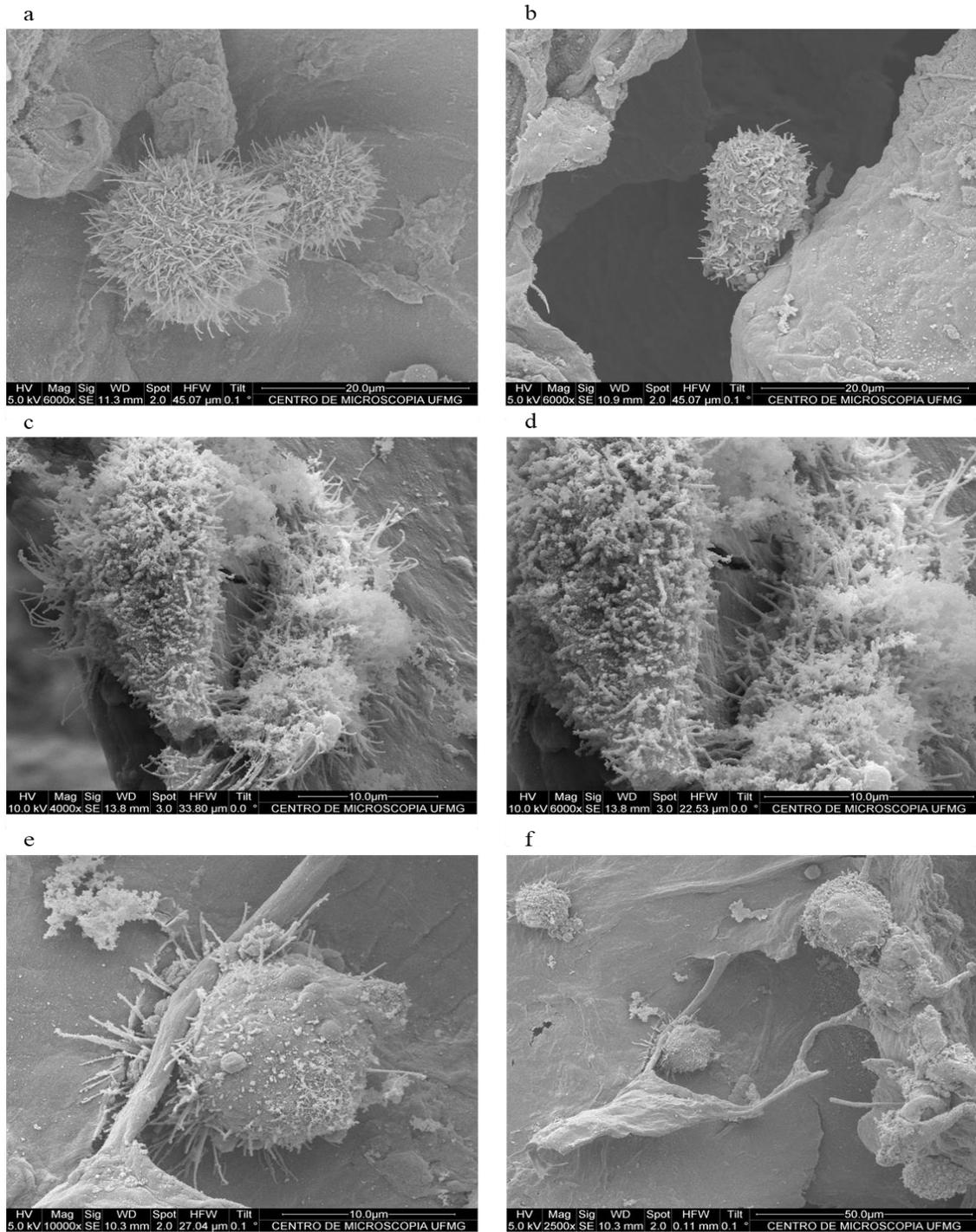


Figura 5.52. Micrografias MEV de células de fibroblastos L929 semeadas no gel semi-IPN alginato/ quitosana e NFCT (50% m/m) –Alg_Qui_NFCT50 após 2 dias de incubação (a-b), 4 dias de incubação (c-d) e 7 dias de incubação (e-f).

Os resultados revelaram a presença dos fibroblastos L929 imobilizados principalmente dentro da estrutura do gel Alg_Qui, de superfície irregular, áspera e porosa. A morfologia das células é mantida esférica e em formato estendido e são frequentemente encontradas em monocamadas de cultura (Figura 5.50). O formato estendido pode ser um indicativo de que as células estavam crescendo e tendo uma considerável capacidade de proliferação.

Para o gel Alg_Qui_CNCT50, pode-se observar que as células penetraram nos poros internos do material e se apresentaram como um aglomerado (Figura 5.51). A fixação e espalhamento das células neste material foram atribuídos à presença dos CNCT (com características hidrofílicas e grupos -COO^-), que contribuíram para a bioadesão e proliferação celular (DOMINGUES *et al.*, 2014; DAN *et al.*, 2016).

Analisando-se a Figura 5.52, pode-se observar, claramente, a bioadesão dos fibroblastos L929 no gel Alg_Qui_NFCT50, em todos os dias avaliados. Tal fato foi atribuído, principalmente, à estrutura das nanofibras, que aumentaram a área superficial dos poros e serviram de “suportes” para a adesão celular. Além disso, os grupos funcionais da superfície do gel (-NH_3^+ e -COO^-) favorecem a adsorção de proteínas e, conseqüentemente, a adesão e proliferação celular (RASHAD *et al.*, 2017). Constatou-se também a formação de prolongamentos finos e longos nos fibroblastos, os filopódios, que emergiram das células e facilitaram a migração através das superfícies porosas do material, demonstrando a compatibilidade das células com o biomaterial (LIU *et al.*, 2015). Assim como observado para o gel Alg_NFCT50 (apresentado na seção 5.2 do presente estudo), aqui também destaca-se a importância das NFCT nos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses: a citocompatibilidade das NFCT e o efeito reforçador das mesmas (que em sua estrutura de rede mimetizam a MEC natural) contribuíram para os excelentes resultados de interação célula-material observados para o gel Alg_Qui_NFCT50. Somando-se a isso, as cadeias externas de alginato/ quitosana, com características hidrofílicas, também podem ter facilitado a ligação celular (DOMINGUES *et al.*, 2014; ARAUJO *et al.*, 2016).

Portanto, a partir dos resultados obtidos para crescimento celular *in vitro* e citocompatibilidade dos géis Alg_Qui_CNCT50 e Alg_Qui_NFCT50, pode-se destacar o potencial dos mesmos para possíveis aplicações biomédicas. Tais materiais tornam-se ainda mais atraentes por promoverem a

bioadesão e proliferação celular, serem de matérias-primas de fontes renováveis e de baixo custo de obtenção. Os géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses apresentam-se como uma alternativa melhorada de materiais potenciais para aplicações em engenharia de tecidos, com propriedades microestruturais, mecânicas e biológicas capazes de auxiliar o crescimento celular e contribuir para o reparo e regeneração de tecidos.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, diferentes géis de alginato e nanoceluloses e géis semi-IPNs de alginato/ quitosana e nanoceluloses foram preparados visando aplicação como novos materiais alternativos para medicina regenerativa/ cicatrização de feridas. Avaliou-se o tipo de nanocelulose adicionada aos sistemas (CNC, CNCT, NFC e NFCT) bem como a concentração das mesmas (10, 36 ou 50% m/m) nas propriedades finais dos géis. Os resultados obtidos sugerem 36-50% (m/m) como uma faixa de concentração ótima para as nanoceluloses adicionadas aos géis.

A adição de CNC, CNCT, NFC ou NFCT aos *géis de alginato* resultou em estruturas com poros maiores e interconectados (variando de 40 a 150 μ m) quando comparadas ao gel de alginato puro. A amostra contendo NFCT (50% m/m) (Alg_NFCT50) exibiu uma distribuição mais uniforme da espessura das paredes o que também contribuiu para uma maior estabilidade do gel em condições fisiológicas. As análises termodinâmico-mecânicas mostraram que os géis de alginato e CNC/ CNCT não apresentaram variações significativas no módulo de armazenamento (E') após um segundo ciclo de aquecimento. Análises das propriedades mecânicas dos géis indicaram também uma redução no módulo de armazenamento destes materiais com o aumento da proporção em massa de CNC ou CNCT nos mesmos (de 36 para 50% m/m). Este comportamento foi correlacionado à formação de fases nos géis com maior concentração de CNC/ CNCT, uma vez que as interações laterais entre os nanocristais são favorecidas, dificultando a dispersão das nanoceluloses na estrutura do material. Por outro lado, foi observado um comportamento diferente (a partir das análises de DMTA) para os géis de alginato contendo NFC/ NFCT: houve um aumento no módulo de armazenamento das amostras após um segundo ciclo de aquecimento, sendo este aumento ainda mais significativo para os géis contendo 50% (m/m) de NFCT ($E'_1 = 0,40\text{MPa}$ e $E'_2 = 3,54\text{MPa}$, à 37°C) quando comparado às amostras contendo 36% (m/m) de NFCT. Tal comportamento foi associado à presença dos grupos carboxílicos nas nanofibras que permitiram uma melhor interação entre as cadeias de alginato (e as NFCT) através de reticulação iônica, termicamente induzida, com os íons Ca^{2+} . Por fim, os estudos

de citocompatibilidade e crescimento celular, utilizando células de fibroblastos L929, demonstraram que os géis Alg_CNCT50 e Alg_NFCT50 apresentaram um potencial para serem utilizados como biomateriais. Porém, os géis Alg_CNCT50, de menor estabilidade física, desintegraram no meio de cultura após o primeiro contato. Uma possível aplicação seria utilizá-los como curativos, principalmente em função das propriedades do alginato de reticulação *in situ*, à presença de íons cálcio nos exsudatos e à presença dos grupos $-\text{COO}^-$ na superfície dos CNCT que podem influenciar na absorção de proteínas e, conseqüentemente, na proliferação celular. Os géis contendo NFCT (Alg_NFCT50) apresentaram as melhores condições de compatibilidade para adesão e crescimento de células de fibroblastos em sua superfície. As NFCT, além de auxiliarem na estabilidade dimensional das amostras do gel Alg_NFCT50, proporcionaram uma estrutura rugosa para as paredes dos poros, semelhante à matriz extracelular natural, contribuindo para a bioadesão e proliferação das células no material.

Os géis *semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses* apresentaram paredes mais densas e rugosas, contribuindo para uma maior resistência mecânica, estabilidade dimensional em diferentes condições de pH e temperatura e uma melhor bioadesão se comparados aos géis de alginato e nanoceluloses, também preparados neste trabalho. A adição de CNC, CNCT, NFC e NFCT aos géis *semi-IPNs alginato/ quitosana* favoreceu a formação de poros mais homogêneos (entre 60 e 80 μm) e interconectados, de grande importância na absorção de líquidos e demais propriedades físico-químicas e mecânicas dos géis. As análises de TMA e DMTA dos géis *semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses* confirmaram que as interações iônicas do sistema (entre os polímeros alginato e quitosana, entre a quitosana e as nanoceluloses TEMPO-oxidadas, entre os grupos $-\text{COO}^-$ e os íons Ca^{2+}) e demais interações secundárias intermoleculares são favorecidas com o aumento da temperatura. Sugere-se, portanto, uma reticulação adicional, termicamente induzida, assim como nos géis de alginato e nanoceluloses. Porém, o tipo de nanocelulose exerceu uma menor influência nas propriedades mecânicas dos géis *semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses* (quando comparados aos géis de alginato e nanoceluloses). Valores de módulos de armazenamento próximos a 8MPa, a 37°C, foram encontrados para os géis Alg_Qui_CNCT50 e Alg_Qui_NFCT50 após um segundo ciclo de aquecimento. Os resultados de citocompatibilidade e crescimento celular revelaram um potencial destes géis para possíveis aplicações biomédicas. As amostras foram compatíveis com as células de

fibroblastos L929 e pode-se observar, principalmente no gel Alg_Qui_NFCT50, a formação de filamentos que unem as células à superfície dos materiais, confirmando a bioadesão e proliferação das células em todos os dias de cultura avaliados.

Portanto, os géis de alginato e nanocelulose e géis semi-IPNs de alginato/ quitosana e nanoceluloses, preparados neste trabalho, são candidatos potenciais para aplicações em engenharia de tecidos e cicatrização de feridas. Suas propriedades microestruturais, mecânicas e biológicas são favoráveis ao crescimento celular e podem contribuir para o reparo e regeneração de tecidos.

CAPÍTULO 7

7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos no presente estudo e nas diversas vantagens apresentadas para a utilização de géis de alginato e nanofibras de celulose e dos géis semi-IPNs de alginto, quitosana e nanoceluloses como biomateriais, sugere-se como perspectivas para trabalhos futuros:

- Avaliar a carga livre dos polímeros e o grau de reticulação dos géis semi-IPNs alginato/ quitosana e nanoceluloses.
- Utilizar genipina como agente reticulante das cadeias de quitosana, de maneira a formar verdadeiras redes interpenetrantes (géis IPNs).
- Realizar estudos de liberação controlada de fármacos e proteínas;
- Realizar ensaios de integridade da membrana celular, atividade metabólica e teor de endotoxinas nos materiais preparados, bem como estudos *in vivo* dos mesmos, para uma avaliação mais detalhada sobre a biocompatibilidade dos mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. O. M.; BIANCHINI, C.; FORTE, A. A. C.; KIST, T. B. L. Influence of the composition and preparation method on the morphology and swelling behavior of alginate-chitosan hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 74, 283-289. **2008**.

AGNIHOTRI, A. S.; KULKARNI, V. R.; MALLIKARJUNA, N. N.; KULKARNI, P. V.; AMINABHAVI, T. M. Electrically modulated transport of diclofenac salts through hydrogels of sodium alginate, carbopol, and their blend polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 96, 301-311. **2005**.

ALEXANDRESCU, L.; SYVERUD, K.; GATTI, A.; CARRASCO, G. C. Cytotoxicity tests of cellulose nanofibril-based structures. *Cellulose*, 20, 1765-1775. **2013**.

ALMEIDA, J. F. S. L. Preparação e Caracterização de Hidrogéis para Aplicações Biomédicas. Tese Doutorado em Engenharia Química - Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Coimbra, **2010**.

ANDRESEN, M.; JOHANSSON, L.S.; TANEM, B.S.; STENIUS, P. Properties and characterization of hydrophobized microfibrillated cellulose. *Cellulose*, 13, 665-677. **2006**.

ANTÔNIO, R. V.; RECOUVREUX, S. O. D.; NAZARIO, A.; TIMBONI, D.; FERRARINI, E.; RODOWANSKI, G. P.; CAUDURO, M. T.; PERES, S. S. Produção de celulose bacteriana a partir de diferentes substratos. *Revista Técnico Científica IFSC*, 3, 176-182. **2012**.

ARAKI, J.; WADA, M.; KUGA, S. Steric stabilization of a cellulose microcrystal suspension by polyethylene glycol grafting. *Langmuir*, 17, 21-27. **2001**.

ARAUJO, A. M.; BRAIDO, G.; SASKA, S.; BARUD, H. S.; FRANCHI, L. P.; ASSUNCAO, R. M. N.; SCAREL-CAMINAGA, R. M.; CAPOTE, T. S. O.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Regenerated cellulose scaffolds: Preparation, characterization and toxicological evaluation, *Carbohydrate Polymers*, 136, 892-898. **2016**.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 13, 223-228. **2003**.

AUGST, A. D.; KONG, H. J.; MOONEY, D. J. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, 6, 623-633. **2006**.

AULIN, C.; AHOLA, S.; JOSEFSSON, P.; NISHINO, T.; HIROSE, Y.; OSTERBERG, M.; WÅGBERG, L. Nanoscale cellulose films with different crystallinities and mesostructures-their surface properties and interaction with water. *Langmuir*, 25, 7675-7685. **2009**.

AZIZI SAMIR, M. A. S.; ALLOIN, F.; PAILLET, M.; DUFRESNE, A. Tangling effect in fibrillated cellulose reinforced nanocomposites. *Macromolecules*, 37, 4313-4316. **2004**.

AZIZI SAMIR, M. A. S.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. *Biomacromolecules*, 6, 612-626. **2005**.

BAJPAI, A. K.; ANJALI, G. WATER. Sorption behaviour of highly swelling carboxy-methylcellulose-g-polyacrylamide hydrogels and release of potassium nitrate as agrochemical. *Carbohydrate Polymers*, 53, 271-279. **2003**.

BARBANI, N.; BERTONI, F.; CIARDELLI, G.; CRISTALINNI, C.; SILVESTRI, D.; COLUCCIO, M. L.; GIUSTI, P.; Bioartificial materials based on blends of dextran and polyvinyl alcohol-co-acrylic acid. *European Polymer Journal*, 41, 3004 -3010. **2005**.

BASU, A.; LINDH, J.; ÅLANDER, E.; STRØMME, M.; FERRAZ, M. On the use of ion-crosslinked nanocellulose hydrogels for wound healing solutions: physicochemical properties and application-oriented biocompatibility studies. *Carbohydrate Polymers*, 174, 299-308. **2017**.

BELL, C. L.; PEPPAS, N. A. Biomedical membranes from hydrogels and interpolymer complexes. *Advances in Polymer Science*, 75, 122-125. **1995**.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, 35-52. **2004**.

BESBES, I.; ALILA, I.; BOUFI, S. Nanofibrillated cellulose from TEMPO-oxidized eucalyptus fibres: Effect of the carboxyl content. *Carbohydrate Polymers.*, 84, 975-983. **2011**.

BETANCOR, L.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 877-882. **2006**.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 83-99. **2010**.

BOATENG, J. S.; MATTHEWS, K. H.; STEVENS, H. N. E.; ECCLESTON, G. M. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 2892-2923. **2008**.

BONINI, C.; HEUX, L.; CAVAILLE, J. Y.; LINDNER, P.; DEWHURST, C.; TERECH, P. Rodlike cellulose whiskers coated with surfactant: A small-angle neutron scattering characterization. *Langmuir*, 18, 3311-3314. **2002**.

BRANT, A. J. C. Preparação e caracterização de hidrogéis a partir de mistura de soluções de quitosana e poli-(n-vinil-2-pirrolidona). Tese de doutorado - Universidade de São Paulo. Instituto de Química, São Paulo. **2008**.

BREGER, J. C.; FISHER, B.; SAMY, R.; POLLACK, S.; WANG, N. S.; ISAYEVA, I. J. Synthesis of click alginate hydrogel capsules and comparison of their stability, water swelling, and diffusion properties with that of Ca²⁺ crosslinked alginate capsules. *Biomed. Mater. Res.*, 103B, 1120-1132. **2015**.

- BROWN, R. M., JR.; WILLISON, J. H.; RICHARDSON, C. L. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73, 4565-4569. **1976**.
- CALIARI, S. R.; BURDICK, J. A. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat. Methods*, 13, 405-414. **2016**.
- CASSU, S.N. Comportamento dinâmico-mecânico e relaxações em polímeros e blendas poliméricas. *Química Nova*, 28, 255-263. **2005**.
- CAVILLE, J. Y.; DUFRESNE, A.; PAILLET, M.; AZIZI SAMIR, M. A. S.; ALLOIN, F.; SANCHEZ, J. Y. French Patent FR2841255. **1999**.
- CAVALCANTI, O. A.; PETENUCCI, B.; BEDIN, A.C. *Rev. Port. Farm.*, 51, 93-6. **2001**.
- CHINGA-CARRASCO, G. Potential and limitations of nanocelluloses as components in biocomposite inks for three-dimensional bioprinting and for biomedical devices. *Biomacromolecules*, 19, 701-711. **2018**.
- CHUNG, C. W.; KANG, J. Y.; YOON, I. S.; HWANG, H. D.; BALAKRISHNAN, P.; CHO, H. J.; CHUNG, K. D.; KANG, D. H.; KIM, D. D. Interpenetrating polymer network (IPN) scaffolds of sodium hyaluronate and sodium alginate for chondrocyte culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88, 711-716. **2011**.
- COSTA Jr. E. de S.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. *Química Nova*, 31, 1460-1466. **2008**.
- COVIELLO, T.; MATRICARDI, P.; MARIANECCI, C.; ALHAIQUE, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release*, 119, 5-24. **2007**.
- CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN, R. M. The Future Prospects of microbial cellulose in biomedical Applications. *Biomacromolecules*, 8, 1-12. **2007**.

DALMAS, F.; CAVAILLE, J. Y.; GAUTHIER, C.; CHAZEAU, L.; DENDIEVEL, R. Viscoelastic behavior and electrical properties of flexible nanofiber filled polymer nanocomposites. Influence of processing conditions. *Composites Science and Technology*, 67, 829-839. **2007**.

DAN, Y.; LIU, O. Y.; LIU, Y.; ZHANG, Y. Y.; LI, S.; FENG, X. B.; SHAO, Z. W.; YANG, C.; YANG, S. H.; HONG, J. B. Development of Novel Biocomposite Scaffold of Chitosan-Gelatin/Nanohydroxyapatite for Potential Bone Tissue Engineering Applications, *Nanoscale Research Letters* 11. **2016**.

DASH, R.; FOSTON, M.; RAGAUSKAS, A. J. Improving the mechanical and thermal properties of gelatin hydrogels cross-linked by cellulose nanowhiskers. *Carbohydrate Polymers.*, 91, 638-645. **2013**.

De FRANCE, K. J.; HOARE, T.; CRANSTON, E. D. Review of hydrogels and aerogels containing nanocellulose. *Chem. Mater.*, 29, 4609-4631. **2017**.

DOMINGUES, R. M. A.; GOMES, M. E.; REIS, R. L. The potential of cellulose nanocrystals in tissue engineering strategies. *Biomacromolecules*, 15, 2327-2346. **2014**.

DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRÆK, G. S. Alginates from Algae. In: *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry*, Ed. STEINBÜCHEL, A., RHEE, S. K., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, p. 1 – 30. **2005**.

DUFRESNE, A. - J. NANOSCI. *Nanotechnology*, 3, 322. **2006**.

DUFRESNE, A. Nanocellulose: a new ageless Bionanomaterial. *Materials Today*, 16, 220-227. **2013**.

DUFRESNE, A. Polymer nanocomposites from Biological Sources. In *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 2nd ed.; Nalwa, H.S., Ed.; American Scientific Publisher: Valencia, CA, USA; in press. **2012**.

DUMITRIU, S.; VIDAL, P. F.; CHORNET, E. Polysaccharides in medicinal applications. Dumitriu, S., Ed; Marcel Dekker, 22, 511-521. **1996**.

EICHHORN, S. J.; DUFRESNE, A.; ARANGUREN, M.; MARCOVICH, N.E.; CAPADONA, J.R.; ROWAN, S.J. *et al.* Review: Current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. *Materials Science*, 45, 1-33. **2010**.

ELBERT, D. L. Bottom-up tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol.*, 22, 674-680. **2011**.

ESTEBAN, E., URENA-BENAVIDES, KITCHENS, C. L. Wide-Angle X-ray Diffraction of Cellulose Nanocrystal-Alginate Nanocomposite Fibers. *Macromolecules*, 44, 3478-3484. **2011**.

ESTEVEZ, A.C.C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. Polymer based nanocomposites: Synthetic strategies for hybrid materials. *Química Nova*, 27, 798-806. **2004**.

FAVIER, V.; CANOVA, G. R.; CAVAILLÉ, J.-Y.; CHANZY, H.; DUFRESNE, A.; GAUTHIER, C. Nanocomposites materials from latex and cellulose whiskers. *Polym. Adv. Technol.*, 6, 351-355. **1995**.

FERNANDES, R. S.; MOURA, M. R.; AOUADA, F. A. Otimização da síntese de hidrogéis nanocompósitos intercalados para possível aplicação na área médica. *Química Nova*, 40, 60-67. **2017**.

FRAMPTON, J. P.; HYND, M. R.; SHULER, M. L.; SHAIN, W. Fabrication and optimization of alginate hydrogel constructs for use in 3D neural cell culture. *Biomed. Mater.*, 6, 015002. **2011**.

GABROVSKA, K.; MARINOV, I.; GODJEVARGOVA, T.; PORTACCIO, M.; LEPORE, M.; GRANO, V.; DIANO, N.; MITA, D. G. The influence of the support nature on the kinetics parameters, inhibition constants and reactivation of immobilized acetylcholinesterase. *Int. J. Biol. Macromol.*, 43, 339-345. **2008**.

GINEBRA, M. P. Desarrollo y caracterización de un cement óseo basado em fosfato tricálcico alfa para aplicaciones quirúrgicas. Tese de Doutorado em Ciências - Universidad Politécnica de Catalunã, Barcelona, Espanha. **1996**.

- GOFFIN, A.-L.; RAQUEZ, J.-M.; DUQUESQUE, E.; SIQUEIRA, G.; HABIBI, Y.; DUFRESNE, A.; DUBOIS, P. Poly ϵ -caprolactone based nanocomposites reinforced by surface-grafted cellulose nanowhiskers via extrusion processing: morphology, rheology, and thermomechanical properties. *Polymer*, 52, 1532-1538. **2011**.
- GOMBOTZ, W.; WEE, S. F. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 194-205. **2012**.
- GONZALEZ, J. S.; LUDEÑA, L. N.; PONCE, A.; ALVAREZ, V. A. Poly(vinyl alcohol)/cellulose nanowhiskers nanocomposite hydrogels for potential wound dressings. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 34, 61. **2014**.
- GRUNERT, M.; WINTER, W. T. Cellulose nanocrystal reinforced acetate butyrate nanocomposites. *Polymer Materials Science and Engineering*, 86, 367. **2002**.
- HABIBI, Y. Key advances in the chemical modification of nanocelluloses. *Chemical Society Reviews*, 43, 519-1542 **2014**.
- HABIBI, Y.; CHANZY, H.; VIGNON, M. TEMPO-mediated surface oxidation of cellulose whiskers. *Cellulose*, 13, 679-687. **2006**.
- HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1638-1649. **2008**.
- HAN, J.; ZHOU, Z.; YIN, R.; YANG, D.; NIE, J. Alginate-chitosan/hydroxiapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds: preparation and characterization. *Int. J. Biol. Macromol*, 46, 199-205. **2009**.
- HAQUE, M. A.; KUROKAWA, T.; GONG, J. P. Super tough double network hydrogels and their application as biomaterials. *Polymer*, 53, 1805-1822. **2012**.
- HAY, D. H.; REHMAN Z.; GHAFOR A.; RHEM B. H. A. Bacterial biosynthesis of alginates *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 752–759. **2010**.

HENNINK, W. E.; NOSTRUM, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 13-36. **2002**.

HENRIKSSON, M.; HENRIKSSON, G.; BERGLUND, L. A.; LINDSTRO, T. An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers. *Eur. Polym. J.*, 43, 3434-3441. **2007**.

HERRICK, F. W.; CASEBIER, R. L.; HAMILTON, J. K.; SANDBERG, K. R. Microfibrillated cellulose: morphology and accessibility. *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.*, 37, 797-813. **1983**.

HEUX, L.; CHAUVE, G.; BONINI, C. Nonflocculating and chiral-nematic self-ordering of cellulose microcrystals suspensions in nonpolar solvents. *Langmuir*, 16, 8210-8212. **2000**.

HINZ, B., PHAN, S. H., THANNICKAL, V. J., GALLI, A., BOCHATON-PIALLAT, M. L., GABBIANI, G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American Journal of Pathology*, 170, 1807-1816. **2007**.

HOFFMAN, A.S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 43, 3-12. **2002**.

HUTCHINSON, J.; M. HAWARD, R. N.; YOUNG, R. J., *The Physics of Glassy Polymers*. 2nd ed.; Chapman and Hall: London, p. 85. **1997**.

INGBER, D. E. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J.*, 20, 811-827. **2006**.

ISAAC, A.; BARBOZA, V.; SKET, F. I.; ALMEIDA, J. R. M.; MONTORO, L. A.; HILGER, A.; MANKE, I. Towards a deeper understanding of structural biomass recalcitrance using phase-contrast tomography. *Biotechnol. Biofuels*, 8, 40. **2015**.

ISAAC, A.; PAULA, J.; VIANA, C. M.; HENRIQUES, A. B.; MALACHIAS, A.; MONTORO, L. A. From nano- to micrometer scale: the role of microwave-assisted acid and alkali pretreatments in the sugarcane biomass structure. *Biotechnol Biofuels*, 11, 73. **2018**.

ISO10993-5, I. O. F. S. I. Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for in Vitro cytotoxicity. **2009**.

ISOGAI, A.; SAITO, T.; FUKUSUMI, H. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. *Nanoscale*, 3, 71. **2011**.

JEEVANANDA, T.; SIDDARAMAIAH. Synthesis and characterization of polyaniline filled PU/PMMA interpenetrating polymer networks. *European Polymer Journal*, 39, 569-578. **2003**.

JIANG, F., HSIEH, Y. L. Chemically and mechanically isolated nanocellulose and their self-assembled structures. *Carbohydrate Polymers*, 95, 32-40. **2013**.

JODDAR, B.; GARCIA, E.; CASAS, A.; STEWART, C. M. Development of functionalized multi-walled carbon-nanotube based alginate hydrogels for enabling biomimetic technologies. *Scientific Reports*, 6, 32456. **2016**.

JOHN, M.J., THOMAS, S. Biofibres and composites. *Carbohydrate Polymers*, 71, 343 - 364. **2008**.

JUNGST, T.; SMOLAN, W.; SCHACHT, K.; SCHEIBEL, T.; GROLL, J. Strategies and Molecular Design Criteria for 3D Printable Hydrogels. *Chem. Rev.*, 116, 1496–1539. **2016**.

KAMEL, S. Nanotechnology and its application in lignocellulosics composites, a mini review. *Express Polymer Letters*, 1, 546-575. **2007**.

KARADAG, E. R.; ÜZUM, Ö. B.; SARAYADIN, D. Swelling equilibria and dye adsorption studies of chemically crosslinked superabsorbent acrylamide/maleic acid hydrogels, *European Polymer Journal*, 38. **2002**.

KAVYA, K.C.; JAYAKUMAR, R.; NAIR, S.; CHENNAZHI, K.P. Fabrication and characterization of chitosan/gelatin/nSiO₂ composite scaffold for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 255-263. **2013**.

KHAN, F.; AHMAD, S. R. Polysaccharides and their derivatives for versatile tissue engineering application. *Macromolecular Bioscience*, 13, 395-421. **2013**.

KIM B.; PEPPAS, N.A. Analysis of molecular interactions in polymethacrylic acid-ethylene glycol hydrogels. *Polymer*, 44, 3701-3707. **2003**.

KIRDPONPATTARA, S.; KHAMKEAW, A.; SANCHAVANAKIT, N.; PAVASANT, P.; PHISALAPHONG, M. Structural modification and characterization of bacterial cellulose–alginate composite scaffolds for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers.*, 132, 146-155. **2015**.

KLEMM, D.; KRAMER, F.; MORITZ, S.; LINDSTROM, T.; ANKERFORS, M.; GRAY, D.; DORRIS, A. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 5438-5466. **2011**.

KOKUFUTA, B. Novel Application for Stimulus-Sensitive Polymer Gels in the Preparation of Functional Immobilized Biocatalysts. *Em Advances in Polymer Science. Responsive Gels: Volume Transitions II*, Editora Springer-Verlag, p. 157. **1993**.

KUMAR, A.; RAO, K. M.; HAN, S. S. Synthesis of mechanically stiff and bioactive hybrid hydrogels for bone tissue engineering applications. *Chemical Engineering Journal*, 317, 119-131. **2017**.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. *Reative & Funcional Polymers*, 46, 1-27. **2000**.

LAHIJI, R. R.; XU, X.; REIFENBERGER, R.; RAMAN, A.; RUDIE, A.; MOON, R. J. Atomic force microscopy characterization of cellulose nanocrystals. *Langmuir*, 26, 4480-4488. **2010**.

LANGER, R., PEPPAS, N.A. *Advances in Biomaterials, Drug Delivery, and Bionanotechnology. AICHE Journal*, 49, 2990-3006. **2003**.

- LAWRIE, G.; KEEN, I.; DREW, B.; CHANDLER-TEMPLE, A.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; GRØNDAHL, L. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. *Biomacromolecules* 8, 2533-254. **2007**.
- LEÃO, A. L.; SOUZA, S. F.; FALCONE, D.; CARASCHI, C. Pulping natural fibers as a raw material aiming the production of nanocellulose nanocomposites. In Proceedings of the second international conference on innovative natural fibre composites for industrial applications, Roma. **2009**.
- LAWRIE, G.; KEEN, I.; DREW, B.; CHANDLER-TEMPLE, A.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; GRØNDAHL, L. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, 8, 2533-2541. **2007**.
- LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.*, 37, 106-126. **2012**.
- LEE, K.; AHN, S.; CHOI, C.H.; LEE, D.; JUNG, W--K.; KIM, G. Functionallized alginate/chitosan biocomposites consisted of cylindrical struts and biologically designed for chitosan release. *Current Applied Physics*, 14, 1105-1106. **2014**.
- LI, J.; MOONEY, D. J.; Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature reviews Materials*, 1, 1-17. **2016**.
- LI, P.; DAI, Y.; ZHANG, J. P.; WANG, A. Q.; WEI, Q. Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine. *Int J Biomed Sci.*, 4, 221-228. **2008**.
- LI, X.; XIE, H.; LIN, J.; XIE, W.; MA, X. Characterization and biodegradation of chitosan-alginate polyelectrolyte complexes. *Polymer Degradation and Stability*, 94, 1-6. **2009**.
- LI, Z.; RAMAY, H. R.; HAUCH, K. D.; XIAO, D.; ZHANG, M. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 26, 3919-3928. **2005**.
- LIAO, Y. F. Mechanism study of cellulose pyrolysis. Tese de Pós-Doutorado, ZheJiang University, HangZhou, China. **2003**.

- LIM, F.; SUN, A. M. Microencapsulated Islets as Bioartificial Pancreas. *Science*, 210, 908-910. **1980**.
- LIMA, I., APPOLONI, C., OLIVEIRA, L. F., & LOPES, R. T. Caracterização de Materiais Cerâmicos através da Microtomografia Computadorizada 3D. *Revista Brasileira da Arqueometria, Restauração e Conservação*, 1, 22-27. **2007**.
- LIN, C.; METTERS, A. T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1379-1408. **2006**.
- LIN, N.; BRUZZESE, C.; DUFRESNE, A. TEMPO-oxidized nanocellulose participating as crosslinking aid for alginate-based sponges. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 4, 4948-4959. **2012**.
- LIN, N.; DUFRESNE, A. Nanocellulose in biomedicine: current status and future prospect. *European Polymer Journal*, 59, 302-325. **2014**.
- LIN, N.; HUANG, J.; CHANG, P. R.; FENG, J.; YU, J. Surface acetylation of cellulose nanocrystal and its reinforcing function in polylactic acid. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1834-1842. **2011**.
- LIU, M. X.; DAI, L. B.; SHI, H. Z.; XIONG, S.; ZHOU, C. R. In vitro evaluation of alginate/halloysite nanotube composite scaffolds for tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 49, 700-712. **2015**.
- LJUNGBERG, N.; CAVAILLE, J. Y.; HEUX, L. Nanocomposites of Isotactic Polypropylene Reinforced with Rod-Like Cellulose Whiskers. *Polymer*, 47, 6285-6292. **2006**.
- LOHANI, A.; SINGH, G.; BHATTACHARYA, S. S.; VERMA, A. Interpenetrating Polymer Networks as Innovative Drug Delivery Systems. *Journal of Drug Delivery*. Volume 2014, Article ID 583612, 11 pages. **2014**.
- LOPES, A., NETO, J. R., MARCHESE, C., FISCHER, G., FIORI, A., & MENDES, R. A microtomografia de raios x aplicada ao estudo da porosidade em rochas. *45º Congresso Brasileiro de Geologia*. **2010**.

- LOPES, C. M. A.; FELISBERTI, M. I. Mechanical behavior and biocompatibility of poly(1-vinyl-2-pyrrolidinone) - gelatin IPN hydrogels. *Biomaterials*, 24, 1279-1284. **2003**.
- LU, J.; ASKELAND, P.; DRZAL, L. T. Surface modification of microfibrillated cellulose for epoxy composite applications. *Polymer*, 49, 1285-1296. **2008**.
- LUCAS, E.F., SOARES, B.G., MONTEIRO, E. Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: Editora e-papers. **2001**.
- LUNZ, J. N., COUTINHO, P. R., SIMÃO, R. A. Painel PEM. PEMM/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **2012**.
- LUPPI, B.; BIGUCCI, F.; MERCOLINI, L.; MUSENGA, A.; SORRENTI, M.; CATENACCI, L.; ZECCHI, V. Novel mucoadhesive nasal inserts based on chitosan/hyaluronate polyelectrolyte complexes for peptide and protein delivery. *J. Pharm. Pharmacol*, 61, 151-157. **2009**.
- MAHDAVINIA, G. R.; POURJAVADI, A.; HOSSEINZADEH, H.; ZOHURIAAN, M. J. Modified chitosan 4. Superabsorbent hydrogels from poly(acrylic) acid-co-acrylamide grafted chitosan with salt- and pH-responsiveness properties. *Eur. Polym. J.*, 40, 1399-1407. **2004**.
- MAOLIN Z, Z.; JUN, L.; MIN, Y.; HONGFEI, H. The swelling behavior of radiation prepared semi-interpenetrating polymer networks composed of polyNIPAAm and hydrophilic polymers. *Radiation Physics and Chemistry*, 58, 397-400. **2000**.
- MARKSTEDT, K.; MANTAS, A.; TOURNIER, I.; ÁVILA, H. M.; HÄGG, D.; GATENHOLM, P. 3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose-alginate bioink for cartilage tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 16, 1489-1496. **2015**.
- MATRICARDI, P.; MEO, C. D.; COVIELLO, T.; HENNINK, W. E.; ALHAIQUE, F. Interpenetrating polymer networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 1172-1187. **2013**.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, C. L. R. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, 34, 831-840. **2011**.

MENEZES, A. J.; SIQUEIRA, G.; CURVELO, A. A. S.; DUFRESNE, A. Extrusion and characterization of functionalized cellulose whiskers reinforced polyethylene nanocomposites. *Polymer*, 50, 4552-4563. **2009**.

MI, F.; SUNG, H.; SHYU, S. Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. *Carbohydrate Polymers*, 48, 61-72. **2002**.

MOREIRA, V. K. F. Desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos biodegradáveis a partir de pectina, amido e nanofibras de celulose. Dissertação Mestrado - Área de Ciência e Engenharia de Materiais - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. **2010**.

MUNIZ E. C.; GEUSKENS G. Influence of temperature on the permeability of polyacrylamide hydrogels and semi-IPNs with polyN-isopropylacrylamide. *Journal of Membrane Science*, 172, 287-293. **2000**.

MURATA-KAMIYA, N.; KAMIYA, H.; KAJI, H.; KASAI, H. Mutational specificity of glyoxal, a product of DNA oxidation, in the lacI gene of wild-type *Escherichia coli* W3110. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 377, 255-262. **1997**.

NAFEA, E.; MARSON, A.; POOLE-WARREN, L.; MARTENS, P. Immunisolating semi-permeable membranes for cell encapsulation: focus on hydrogels. *J. Control. Release*, 154, 110-122. **2011**.

NASERI, N.; DEEPA, B.; MATHEW, A. P.; OKSMAN, K.; GIRANDON, L. Nanocellulose-based interpenetrating polymer network IPN hydrogels for cartilage applications. *Biomacromolecules*, 17, 3714-3723. **2016**.

NERY, J. C. Obtenção e caracterização de filmes contendo alginato de sódio e quitosana para potencial aplicação no tratamento de lesões cutâneas. Dissertação de mestrado - Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. Programa de pós-graduação em Engenharia de Materiais. Belo Horizonte. **2014**.

NASERI, N.; MATHEW, A. P.; GIRANDON, L.; FRÖHLICH, M.; OKSMAN, K. Porous electrospun nanocomposite mats based on chitosan-cellulose nanocrystals of wound dressing: effect of surface characteristics of nanocrystals. *Cellulose*, 22, 521-534. **2016**.

NOOY, A. E. J.; BESEMER, A. C.; BEKKUM, H. Highly selective tempo mediated oxidation of primary alcohol groups in polysaccharides. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 113, 165-166. **1994**.

NORDLI, H. R.; CHINGA-CARRASCO, G.; ROKSTAD, A. M.; PUKSTAD, B. Producing ultrapure wood cellulose nanofibrils and evaluating the cytotoxicity using human skin cells. *Carbohydrate Polymers*, 150, 65-73. **2016**.

NWE, N.; FURUIKE, T.; TAMURA, H. Selection of a biopolymer based on attachment, morphology and proliferation of fibroblast NIH/3T3 cells for the development of a biodegradable tissue regeneration template: Alginate, bacterial cellulose and gelatina. *Process Biochem.*, 45, 457-466. **2010**.

PÄÄKÖ, M.; ANKERFORS, M.; KOSONEN, H.; NYKANEN, A.; AHOLA, S.; OSTERBERG, M.; RUOKOLAINEN, J.; LAINE, J.; LARSSON, P. T.; IKKALA, O.; LINDSTROM, T. Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. *Biomacromolecules*, 8, 1934-1941. **2007**.

PALSSON, B. O.; BHATIA, S. N. *Tissue Engineering*. New Jersey: Prentice Hall. **2003**.

PARIENTE, J. L.; KIM, B. S.; ATALA, A. In vitro biocompatibility evaluation of naturally derived and synthetic biomaterials using normal human bladder smooth muscle cells. *J. Urol.*, 167, 1867-1871. **2002**.

PARK, K. Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery. Purdue University Publishing Co. Inc., Lancaster, USA. **1993**.

PARK, M.; LEE, D.; HYUN, J. Nanocellulose-alginate hydrogel for cell encapsulation. Carbohydrate Polymers, 116, 223-228. **2015**.

PASPARAKIS G.; BOUROPOULOS N. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads. International Journal of Pharmaceutics, 323, 34-42. **2006**.

PASTORE, M. C. T.; OLIVEIRA, K. C. C.; RUBIM, C. J.; SANTOS, O. K. Efeito do intemperismo artificial em quatro madeiras tropicais monitorado por espectroscopia de infravermelho (DRIFT). Química Nova, 31, 2071-2075. **2008**.

PAVLATH, A.E.; GOSSETT, C.; CAMIRAND, W. E ROBERTSON, G.H. Ionomeric films of alginic acid. Journal of Food Science, 64, 61-63. **1999**.

PENG, X.W.; REN, J. L.; ZHONG, L. X.; PENG, F.; SUN, R. C. Xylan-rich Hemicelluloses-graft-Acrylic Acid Ionic Hydrogels with Rapid Responses to pH, Salt, and Organic Solvents. J. Agric. Food Chem., 59, 8208-8215. **2011**.

PEPPAS, N. A. Hydrogels in Medicine and Pharmacy, CRC Press, Boca Raton, FL. 1987.

PEPPAS, N.A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 50, 27-46. **2000**.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. Biomaterials, 17, 1553-1561. **1996**.

PODSIADLO, P.; CHOI, S. Y.; SHIM, B.; LEE, J.; CUDDIHY, M.; KOTOV, N. A. Molecularly engineered nanocomposites: layer-by-layer assembly of cellulose nanocrystals. Biomacromolecules, 6, 2914-2918. **2005**.

PUANGSINA, B., YANGA, Q., SAITO, A, T., ISOGAI, A. International Journal of Biological Macromolecules, 59, 208-213. **2013**.

QUEIROZ, M. P. Síntese e caracterização de hidrogéis superabsorventes obtidos a partir da copolimerização de acrilamida, n isopropilacrilamida e metacrilato de sódio. Dissertação Mestrado em Engenharia Química - Engenharia Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. **2010**.

RAMLI, H. R.; SOON, F. C.; RUS, M. Z. A. Synthesis of Chitosan /Alginate/ Silver Nanoparticles Hydrogel Scaffold. MATEC Web of Conferences, 78, 01031. **2016**.

RANBY, B. G. Aqueous colloidal solutions of cellulose micelles Acta Chem. Scand., 3, 649-650. **1949**.

RANBY, B.; RIBI, E. Über den Feinbau der Zellulose, 6, 12-14. **1950**.

RANI, M.; AGARWAL, A.; NEGI, Y. Characterization and biodegradation studies for interpenetrating polymeric network (IPN) of chitosan-amino acid beads. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2, 71–84. **2011**.

RASHAD, A.; MUSTAFA, K.; HEGGSET, E.B.; SYVERUD, K. Cytocompatibility of wood-derived cellulose nanofibril hydrogels with different surface chemistry. Biomacromolecules, 18, 1238–1248. **2017**.

RASTOGI, R.; SULTYANA, Y.; AQIL, M.; ALI, A.; KUMAR, S.; CHUTTANI, K.; MISHRA, A. K. Alginate microspheres of isoniazid for oral sustained drug delivery. International Journal of Pharmaceutics 334, 71- 77. **2007**.

RECOUVREUX, D. O. S. Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos. Tese Doutorado em Engenharia Química - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. **2008**.

- REDDY, K. O.; GUDURI, B. R.; RAJULU, A. V. Structural characterization and tensile properties of borassus fruit fibers. *J Appl. Polym. Sci.*, 114, 603-611. **2009**.
- REDDY, J.; NAGASHUBHA, B.; REDDY, M.; MOIN, A.; SHIVAKUMAR, H. G. Novel interpenetrating polymer matrix network microparticles for intestinal drug delivery. *Current Drug Delivery*, 11, 191–199. **2013**.
- RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, 57, 397-430. **2008**.
- ROBERTS, G. A. F. Structure of chitin and chitosan. *Chitin Chemistry*. Londres: Macmillan, p.101, **1992**.
- ROMAN, M., WINTER, W. T. Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose. *Biomacromolecules*, 5, 1671-1677. **2004**.
- RONG, M. Z.; ZHANG, M.Q.; LIU, Y.; YANG, G.C.; ZENG, H.M. The effect of fiber treatment on the mechanical properties of unidirectional sisal-reinforced epoxy composites. *Compos. Sci. Technol.*, 61, 1437-1447. **2001**.
- ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, 55, 35-58. **1991**.
- SADAHIRA, C. M. Síntese, caracterização e avaliação do perfil de liberação in vitro de hidrogéis do álcool polivinílico pH sensitivos processados por métodos físico-químicos. Dissertação Mestrado em Engenharia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, **2007**.
- SAHINER N., PEKEL N., GOVEN O. Radiation synthesis of n-vinyl 2- pyrrolidone/acrylonitrile interpenetrating polymer networks and their use in uranium recovery from aqueous systems. *Radiation Physics and Chemistry*, 52, 271- 276. **1998**.

SAITO, T.; ISOGAI, A. TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. The effect of oxidation conditions on chemical and crystal structures of the water-insoluble fractions. *Biomacromolecules*, 5, 1983-1989. **2004**.

SAITO, T.; KIMURA, S.; NISHIYAMA, Y.; ISOGAI, A. Cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. *Biomacromolecules*, 8, 2485-91. **2007**.

SARTORI, C.; FINCH, D.S.; RALPH, B. E GILDING, K. Determination of the cation content of alginate thin films by FTIR spectroscopy. *Polymer*, 38, 43-51. **1997**.

SATYANARAYANA, K.G.; SUKUMARAN, K.; MUKHERJEE, P.S.; PAVITHRAN, C.; PILLAI, S.G.K. Natural fibre-polymer composites. *Cem. Concr. Compos.*, 12, 117-136. **1990**.

SEGAL, L.; CREELY, J.; MARTIN, A.; CONRAD, C. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Text. Res. J.*, 29, 786-794. **1959**.

SEHAQUI, H.; MUSHI, N. E.; MORIMUNE, S.; SALAJKOVA, M.; NISHINO, T.; BERGLUND, L. A. Cellulose nanofiber orientation in nanopaper and nanocomposites by cold drawing. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 4, 1043-1049. **2012**.

SEHAQUI, H.; ZHOU, Q.; BERGLUND, L. A. High-porosity aerogels of high specific surface area prepared from nanofibrillated cellulose NFC. *Compos. Sci. Technol.*, 71, 1593–1599. **2011**.

SENEL, S.; IKINCI, G.; KAŞ, S.; YOUSEFI-RAD, A.; Sargon, M. F.; Hincal, A.A. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 193, 197-203. **2000**.

SILVA, C. R. S. H.; SANTOS, R. C. S. K.; FERREIRA, I. E. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, 29, 776-785. **2006**.

SILVA, F. P. Síntese e caracterização de hidrogéis de poli(nisopropilacrilamida-co-ácido metacrílico) e sua aplicação como sistemas de liberação controlada de medicamentos. *Dissertação Mestrado em*

Engenharia Química - Engenharia Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. **2006.**

SILVA, K. M. M. N. Caracterização de hidrogéis semi-interpenetrantes de alginato e quitosana reticulados com cloreto de cálcio ou glutaraldeído: estudo do efeito das condições de preparo em suas propriedades mecânicas e físico-químicas. Dissertação Mestrado em Engenharia Química - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. **2015.**

SILVA, M.A. Desenvolvimento e caracterização de filmes compostos de alginato e quitosana contendo natamicina como agente antimicótico. Tese Doutorado em Engenharia Química - Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas - São Paulo. **2009.**

SILVA, R.; HARAGUCHI, S.K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. *Quim. Nova*, 32, 661-671. **2009.**

SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulosic Bionanocomposites: A Review of Preparation, Properties and Applications. *Polymers*, 2, 728-765. **2010.**

SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. New Process of Chemical Grafting of Cellulose Nanoparticles with a Long Chain Isocyanate. *Langmuir*, 26, 402-411. **2010.**

SKAUGRUD, O.; HAGEN, A.; BORGERSEN, B.; DORNISH, M. Biomedical and pharmaceutical applications of alginate and chitosan. In Harding, S. E. Ed. *Biotechnol. Genet. Eng.*, 16, 23-40. **1999.**

SMITHA, B.; SRIDHAR, S.; KHAN, A. A. Chitosan-sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. *Eur. Polym. J.*, 41, 1859-1866. **2005.**

SOUZA, F. S. Obtenção de nanofibras de curauá e aplicação como reforço em compósitos baseados em PVA. Dissertação Mestrado em Agronomia - Energia na Agricultura - Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP, Botucatu, São Paulo. **2010.**

SOUZA, K.V; ZAMORA, P. P.; ZAWADZKI, S. F. Imobilização de ferro (II) em matriz de alginato e sua utilização na degradação de corantes têxteis por processos fenton. *Química Nova*, 31, 1145-1149. **2008**.

TAKAHASHI, S. H. Desenvolvimento de Hidrogéis Inteligentes como meio de Liberação Controlada de Fármaco. Tese Doutorado em Química - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. **2014**.

TAQIEDDIN, E.; AMIJI, M. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials*, 25, 1937-1945. **2004**.

TEIXEIRA, E. M.; OLIVEIRA, R. C.; MATTOSO, L. H. C.; CORRÊA, A. C.; PALADIN, P. D. Nanofibras de Algodão Obtidas sob Diferentes Condições de Hidrólise Ácida. *Polímeros*. 20, 264-268. **2010**.

TORRADO, S.; PRADA, P.; de la TORRE, P.M.; TORRADO, S. Chitosan-poly(acrylic) acid polyionic complex: in vivo study to demonstrate prolonged gastric retention. *Biomaterials*, 25, 917-923. **2004**.

TURBAK, A. F.; SNYDER, F. W.; SANDBERG, K. R. Microfibrillated cellulose, a new cellulose product: properties, uses, and commercial potential, *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.*, 37, 815-827. **1983**.

USUKI, A.; KOJIMA, Y.; KAWASUMI, M.; OKADA, A.; KURAUCHI, T.; KAMIGAITO, O. Characterization and Properties of Nylon-6 - Clay Hybrid, 200-218. **1990**.

WAKE, M. C.; PATRICK, JR. C. W.; MIKOS, A. G. Pore morphology effects on the fibrovascular tissue growth in porous polymer substrates. *Cell. Transplant.*, 3, 339-343. **1994**.

WAMBUA, P.; IVENS, J.; VERPOEST, I. Natural fibres: can they replace glass in fibre reinforced plastics. *Compos. Sci. Technol.*, 63, 1259-1264. **2003**.

- WANG, K.; NUNE, K.; MISRA, R. The functional response of alginate-gelatin-nanocrystalline cellulose injectable hydrogels toward delivery of cells and bioactive molecules. *Acta Biomater.*, 36, 143-151. **2016**.
- WEN, Y.; ZHU, X.; GAUTHIER, D. E.; AN, X.; CHENG, D.; NI, Y.; YIN, L. Development of poly(acrylic acid)/ nanofibrillated cellulose superabsorbent composites by ultraviolet light induced polymerization. *Cellulose*, Issue 4. **2015**.
- WETTON R. E.; DAWKINS, J. V. *Developments in Polymer Characterization*. Elsevier Applied Sci. Publishers: London, p. 179. **1986**.
- WICHTERLE, O.; LIM, D. Hydrophilic Gels in Biologic Use. *Nature*, 185, 117. **1960**.
- WU, CHIN-SAN. Mechanical properties, biocompatibility, and biodegradation of cross-linked cellulose acetate-reinforced polyester composites. *Carbohydrate Polymers*, 105, 41-48. **2014**.
- WU, J.Y.; LIU, S.Q.; HENG, P.W.; YANG, Y.Y. Evaluating Proteins Release from, and their interactions with, Thermosensitive polyN-Isopropylacrylamide Hydrogels. *Journal of Controlled Release*, 102, 361-372. **2005**.
- WUNDERLICH, B. In *Thermal Characterization of Polymer Materials*; Turi, E. A., ed.; 2nd. ed., Academic Press Inc.: New York, p. 305. **1997**.
- XU, T.; BAICU, C.; AHO, M.; ZILE, M.; BOLAND, T. Fabrication and characterization of bio-engineered cardiac pseudo tissues. *Biofabrication*, 1, 035001. **2009**.
- YADOLLAHI, M.; GHOLAMALI, I.; NAMAZI, H.; AGHAZADEH, M. Synthesis and characterization of antibacterial carboxymethyl cellulose/ZnO nanocomposite hydrogels. *Int. J. Biol. Macromol.*, 74, 141. **2015**.
- YANG, H.; YAN, R.; CHEN, H.; LEE, D. H.; ZHENG, C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 86, 1781-1788. **2007**.

YANG, J.; HAN, C. R.; DUAN, J. F.; XU, F.; SUN, R. C. Mechanical and viscoelastic properties of cellulose nanocrystals reinforced polyethylene glycol nanocomposite hydrogels. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 5, 3199-3207. **2013**.

YANG, Y.; URBAN, M. W. Self-Healing Polymeric Materials. *Chem. Soc. Rev.*, 42, 7446-7467. **2013**.

YANNAS, I.V.; LEE, E.; ORGILL, D. P. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proceedings of the National Academy of Science*, 86, 933-937. **1989**.

YILDIRIM, E. D.; YIN X.; NAIR, K.; SUN, W. Fabrication, Characterization, and Biocompatibility of Single-Walled Carbon Nanotube-Reinforced Alginate Composite Scaffolds Manufactured Using Freeform Fabrication Technique. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 87, 406-414. **2008**.

ZHANG, X.; HUANG, J.; CHANG, P. R.; LI, J.; CHEN, Y.; WANG, D.; YU, J.; CHEN, J. Structure and properties of polysaccharide nanocrystal-doped supramolecular hydrogels based on cyclodextrin inclusion. *Polymer*, 51, 4398-4407. **2010**.

ZHANG, Y.; LIU, J.; HUANG, L.; WANG, Z.; WANG, L. Design and performance of a sericin-alginate interpenetrating network hydrogel for cell and drug delivery. *Sci. Rep.*, 5, 12374. **2015**.

ZHOU, C.; WU, Q.; YUE, Y.; ZHANG, Q. J. Application of rod-shaped cellulose nanocrystals in polyacrylamide hydrogels. *Colloid Interface Sci.* 353, 116-123. **2011**.

ZHOU, Y.; FU, S.; ZHANG, L.; ZHAN, H. Superabsorbent nanocomposite hydrogels made of carboxylated cellulose nanofibrils and CMC-g-p(AA-co-AM). *Carbohydrate Polymers*, 97, 435. **2013**.

ZIMMERMANN, T.; BORDEANU, N.; STRUB, E. Properties of nanofibrillated cellulose from different raw materials and its reinforcement potential. *Carbohydrate Polymers*, 79, 1086-1093. **2010**.

APÊNDICE

A Figura X.1 (a-b) apresenta curvas de DSC da quitosana PHYTOMARE (pura), utilizada no presente estudo, sob atmosfera de hélio, a 10°C/ min.

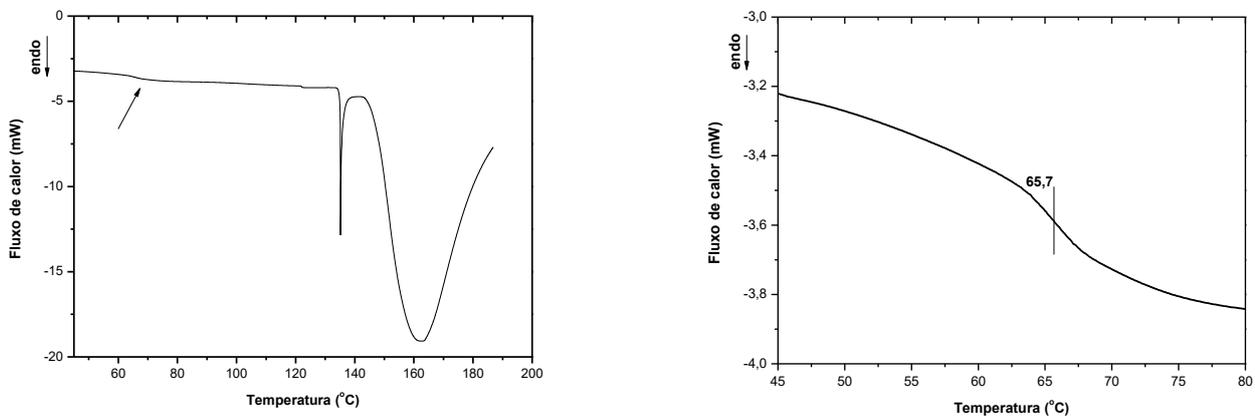


Figura X.1: Variação do fluxo de calor em função da temperatura para a quitosana – (a) curva de DSC na faixa de temperatura entre 45 e 200°C; (b) aplicação do DSC na faixa de temperatura entre 45 e 80°C.

A Figura X.2 apresenta a análise termogravimétrica do gel de alginato e NFCT (50% m/m) sem tratamento térmico e após tratamento em estufa, a 80°C, por 1 hora e por 4h.

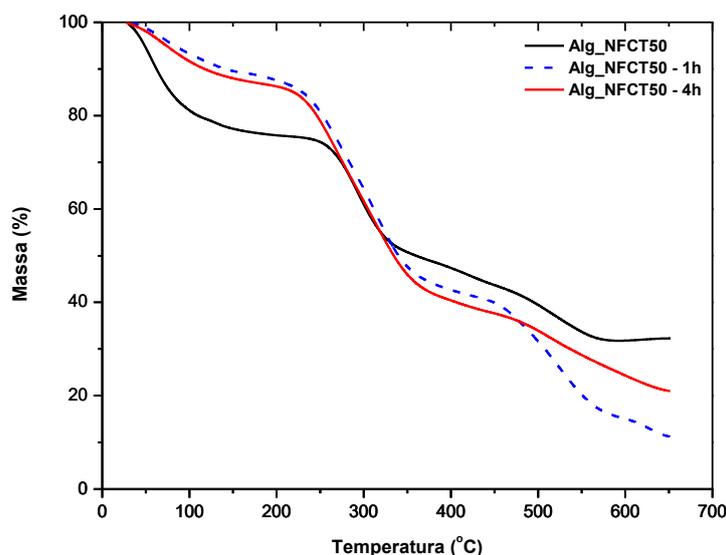


Figura X.2: Curvas de TGA do gel de alginato e NFCT (50% m/m) sem tratamento térmico e após tratamento em estufa, a 80°C, por 1 hora e por 4h.

A partir da análise da Figura X.2, pode-se observar três principais eventos de perda de massa para todas as amostras: o primeiro evento (de 20 a 200°C) corresponde à perda de água e a primeira decomposição dos oligossacarídeos (ABREU, 2008; LI *et al.*, 2009). Como esperado, para as amostras tratadas termicamente, em função da eliminação de água durante o tratamento térmico, pode-se observar uma menor perda de massa durante este primeiro evento.

O segundo evento (entre 200 e 425°C) corresponde à degradação complexa dos glicosídeos presentes na estrutura do alginato e das nanoceluloses: despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas.

O terceiro evento ocorre devido à degradação de resíduos carbônicos para formação de produtos gasosos de baixa massa molar. No presente estudo, pode-se associar os resíduos do processo de degradação térmica (após 650°C) aos íons Ca^{2+} utilizados como agentes de reticulação para os grupos -COO^- das cadeias de alginato e nanoceluloses TEMPO-oxidadas e também às interações eletrostáticas entre as cadeias de alginato, nanoceluloses e íons Ca^{2+} . O maior teor de cinzas observado para as amostras Alg_NFCT50 e Alg_NFCT50_4h, quando comparadas à amostra

Alg_NFCT50_1h, pode ser justificado pela heterogeneidade das amostras (resultando em diferentes quantidades de cálcio ao longo das amostras em estudo).