

**Ericka Cirigo y Pérez**

**PRODUÇÃO DE BIOCOMPÓSITOS POR  
POLICONDENSAÇÃO DE L-ÁCIDO LÁCTICO EM  
HIDROGÉIS DE CELULOSE BACTERIANA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto.

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do  
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cirigo y Pérez, Ericka  
PRODUÇÃO DE BIOCOMPÓSITOS POR POLICONDENSAÇÃO DE L-ÁCIDO  
LÁCTICO EM HIDROGÉIS DE CELULOSE BACTERIANA / Ericka Cirigo  
y Pérez ; orientador, Luismar Marques Porto -  
Florianópolis, SC, 2014.  
99 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Biocompósitos. 3.  
Policondensação de Poli(L-ácido láctico). 4. Celulose  
bacteriana. 5. Polimerização sem catalisadores. I. Porto,  
Luismar Marques. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
III. Título.

Ericka Cirigo y Pérez

**PRODUÇÃO DE BIOCOMPÓSITOS POR  
POLICONDENSAÇÃO DE L-ÁCIDO LÁCTICO EM  
HIDROGÉIS DE CELULOSE BACTERIANA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 17 de abril de 2014.

---

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado  
Coordenador do PósENQ

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Luismar Marques Porto  
Presidente  
UFSC

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Paula Testa Pezzin  
Membro Externo  
UNIVILLE

---

Prof. Dr. Carlos Renato Rambo  
Membro Externo  
UFSC

---

Dra. Silviene Novikoff  
Membro Externo  
UNIFESP



À minha família e aos meus amigos.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço enormemente à vida por toda a série de eventos que me trouxeram até aqui. Havia infinitas possibilidades e afortunadamente me apresentou a possibilidade de chegar aqui. Quero também agradecer às pessoas que me acompanharam ao longo de todo o processo, porque me fizeram desfrutar cada parte do caminho e me ajudaram a atingir mais um objetivo.

Agradeço infinitamente ao meu amor, Jonatan Neitzel por ter me incentivado a começar esta aventura. Obrigada pelo apoio ao longo de todo o caminho, por tua paciência, teu amor e por não me deixar desistir nunca. Obrigada mi vida!

Agradeço também à minha família. À família no México por acompanhar todo o processo ao longo destes dois anos. Agradeço aos meus pais: Elvia e Agustin e minhas irmãs: Zoraya e Zaida por se interessar em meu projeto e me motivar todos os dias. À minha família no Brasil sem a qual não teria sido possível fazer tudo isto. Obrigada Carmen, Moacir e Thiago Neitzel por seu carinho, por me ajudarem, cuidarem de mim e me fazerem recarregar as baterias toda semana.

Quero também fazer um agradecimento muito especial à Luciane Zickuhr e ao Paulo Kugharski porque sem eles simplesmente não teria sido possível atingir este objetivo. Graças a vocês, à Viviane e Kali, nunca me senti sozinha. Muito obrigada por terem me recebido na sua casa, muito obrigada por tudo.

Agradeço ao professor Dr. Luismar Marques Porto, por ter me dado a oportunidade de fazer parte do grupo, pela orientação e por ter me mostrado um enfoque da engenharia que abre uma janela de infinitas possibilidades.

Não posso deixar de agradecer aos meus muito queridos amigos e não oficiais co-orientadores: Guilherme Colla, Karina Cesca e Drielle Justiniano Souza. Obrigada por sua ajuda, suas ideias, seus comentários, por todas suas contribuições ao meu trabalho, por sua alegria e por todos esses momentos maravilhosos no lab, vocês fizeram esta experiência simplesmente inesquecível.

Obrigada também a todos os pesquisadores do InteLab, a todas as pessoas maravilhosas que o integram: Andréa L. Pimenta, Julia V. Castro, Camila Q. Paes, Charles Kondageski, Lya Piaia, Samara S. de Souza, Joanna F. Godinho, Isla F. Pereira, Afonso Londero, Alencar Cabral, Maikon Kelbert. Aos nossos queridos alunos de iniciação científica: Tuane C. Antônio, Fernanda P. Rotunno, Isadora S. Rufino, João C. S. Lobe, Beatriz Espíndola, Raul S. dos Anjos, Evandro Y.

Ynumaru, Beatriz V. Martinho, Manuela C. de Oliveira. Meninos, muito obrigada por tudo, por seu trabalho, por sua dedicação, por me ajudarem a cuidar dos meus experimentos, por sua amizade e por fazer incríveis todos os dias no laboratório.

Agradeço também às pessoas que fizeram parte desta jornada: Dra. Renata A. N. Pértile, Dra. Fernanda Berti, obrigada pela amizade, as ideias e pela ajuda. À Taisa Stumpf, Carolina Brown Streb, Camila Schroeder e Jéssica B. Cruz.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, muito especialmente ao Américo Cruz pela ajuda incondicional. Ao Laboratório de Materiais Vitrocerâmicos (Vitrocer) da UFSC por me permitir fazer as análises de TGA. À Central de Análises Químicas da UFSC. Ao Laboratório de Materiais (LabMat) e ao Laboratório de Polímeros e Compósitos – POLICOM da Universidade Federal de Santa Catarina, muito especialmente ao Prof. Dr. Guilherme M. O. Barra pela ajuda com as análises de FTIR. À Professora Dra. Débora de Oliveira pela doação da peneira molecular utilizada neste trabalho.

Ao CNPq e FINEP pelo apoio financeiro.



No te rindas que la vida es eso,  
continuar el viaje,  
perseguir tus sueños,  
destrabar el tiempo,  
correr los escombros y destapar  
el cielo...

(Mario Benedetti)



## RESUMO

Desenvolver um biocompósito à base de poli(L-ácido láctico) (PLLA) e celulose bacteriana (CB) com uma boa dispersão das nanofibras de CB (hidrofílicas), na matriz de PLLA (hidrofóbica), pode gerar uma nova gama de materiais poliméricos biodegradáveis com aplicações em diversas áreas tecnológicas, incluindo a área biomédica. O objetivo deste trabalho foi produzir biocompósitos de PLLA e CB mediante a policondensação direta de L-ácido láctico, dentro dos hidrogéis de CB, sem uso de catalisadores. Biocompósitos foram produzidos por policondensação a 90 °C em períodos de 24 e 48 h. A caracterização dos biocompósitos de PLLA/CB produzidos foi feita por Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria exploratória diferencial (DSC). Avaliou-se também a absorção hídrica e a degradação hidrolítica, assim como a citotoxicidade do novo biomaterial. Na análise de MEV, os biocompósitos apresentaram uma microestrutura diferente da CB e do PLLA puros. As nanofibras de celulose ficaram retidas dentro da matriz de PLLA formada, mas conservando sua distribuição original, sugerindo que uma boa dispersão no biocompósito foi obtida. Pela análise de FTIR foi possível a confirmação da formação do PLLA, mas não foram detectados picos de absorção ou deslocamentos significativos que possam sugerir uma interação química entre a CB e o PLLA produzido. Por análise térmica foi determinado que a perda de massa é estável no intervalo entre 98,5 e 150 °C para os biocompósitos tanto após 24 como 48 h de polimerização. A temperatura de transição vítrea,  $T_g$ , apresentou uma considerável diminuição em comparação com a do PLLA puro, o que sugere que as fibras de CB na matriz de PLLA causaram um efeito similar ao ocasionado por plastificantes. Os resultados do teste de degradação hidrolítica mostraram que houve um processo hidrolítico nas amostras dos biocompósitos de 24 e 48 h de polimerização, os quais sofrem uma perda de massa de 4,64 e 5,17 %d<sup>-1</sup>, respectivamente. A avaliação da citotoxicidade mostrou que os biocompósitos apresentam menor viabilidade celular com respeito à CB pura, atribuída ao aumento de acidez do meio. A taxa de degradação hidrolítica pode explicar o processo de acidificação do meio de cultura que inviabilizou a adesão celular no biocompósito.

**Palavras-chave:** Biocompósitos. Policondensação. Poli(L-ácido láctico). Celulose bacteriana.



# PRODUCTION OF BIOCOMPOSITES BY POLYCONDENSATION OF L-LACTIC ACID INSIDE HYDROGELS OF BACTERIAL CELLULOSE

## ABSTRACT

Developing a biocomposite based on poly(L-lactic acid) (PLLA) and bacterial cellulose (BC) with good dispersion of cellulose nanofibers (hydrophilic) inside the PLLA matrix (hydrophobic) can generate a new range of biodegradable polymeric materials with applications in different technological fields, including biomedical applications. The aim of this work was to produce biocomposites made of PLLA and BC by direct polycondensation of L-lactic acid within the BC hydrogels without using catalysts. Biocomposites were produced by polycondensation at 90 °C in periods of 24 and 48 h. The PLLA/CB biocomposites were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM), Thermogravimetric Analysis (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). We also evaluated water absorption and hydrolytic degradation of the material as well as its cytotoxicity. SEM analysis showed a different microstructure in the samples compared with pure BC and pure PLLA. The cellulose nanofibers were trapped inside the PLLA matrix; however, they keep their original spatial distribution, that is, there is a good dispersion of the fibers in the biocomposite. FTIR analysis confirmed the production of poly(L-lactic acid) but no significant displacements or absorption peaks that might suggest a chemical interaction between the CB and PLLA produced were detected. Thermal analysis determined that the weight loss is insignificant in the range of 98.5 to 150 °C for 24 h and 48 h of polymerization. The temperatures  $T_g$  and  $T_m$  were considerably reduced in comparison with the pure PLLA, suggesting that BC fibers inside the PLLA matrix caused a similar effect as the one caused by plasticizers addition. The hydrolytic degradation assay showed that there is a hydrolytic process in the biocomposites samples after 24 and 48 hours of polymerization, with a loss in mass of 4.64 and 5.17 %  $d^{-1}$ , respectively. Cytotoxicity assay indicated that the present biocomposites have lower cell viability with respect to pure BC, caused by acidified culture medium. Their hydrolytic degradation rate explains the process of acidification of the cell culture medium preventing cell adhesion and better viability.

**Keywords:** Biocomposites. Polycondensation. Poly(L-lactic acid). Bacterial cellulose.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Moléculas de L- e D-ácido láctico. Adaptado de Jem e colaboradores (2010)..... 36
- Figura 2 - Métodos de síntese de poli(ácido láctico). Adaptado de: Garlotta (2001) e Lopes (2012). ..... 38
- Figura 3 - Micrografias eletrônicas de transmissão de grânulos intracelulares de homopolímero de PLA e do copolímero P(3HB-co-LA) acumulados em células de *E. coli* recombinante. A: Grânulos de homopolímeros de PLA acumulados na linhagem recombinante expressando JLX7 e Pct532Cp PhaC1400Ps6-19. B: Grânulos de homopolímeros de PLA acumulados na linhagem recombinante expressando JLX10 e Pct540Cp PhaC1310Ps6-19. C: P(3HB-co-55 mol% LA) copolímero acumulado na linhagem recombinante expressando JLX10 PhaC1310Ps6-19 e Pct540Cp. Barras de escala: 500 nm. Fonte: Jung (2010)..... 43
- Figura 4 - Sistema de Polimerização. 1) Placa de aquecimento com agitador magnético. (2) Balão de polimerização de três bocas. (3) Termômetro. (4) Entrada de nitrogênio. (5) Cotovelo. (6) Condensador. (7) Trap. (8) Bomba de vácuo. .... 52
- Figura 5 - Ensaio de viabilidade celular. A) Controle e amostras foram submersos em meio de cultura 24 horas antes do teste. B) Fibroblastos de camundongo, linhagem L929 foram mantidos em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C. (C e D) Fibroblastos L929 foram semeados numa proporção de 10<sup>5</sup> células/poço. .... 57
- Figura 6 - Produção de hidrogéis de celulose bacteriana. A) Inóculo de *Gluconoacetobacter hansenii*, B) Membranas de celulose bacteriana hidratadas, C) Esferas de celulose bacteriana hidratadas. .... 60
- Figura 7 - Hidrogéis de celulose bacteriana utilizados na polimerização *in situ*. A) Membranas de CB com diâmetro de 1,54 cm, equivalente ao diâmetro interno dos poços da placa de 24 poços. B) Esferas de CB com diâmetro médio de 0,528 ± 0,105 cm. .... 60
- Figura 8 - Amostras de compósitos obtidos após 24 h de polimerização a 75 °C. .... 61

Figura 9 - Amostras hidratadas dos biocompósitos de PLLA e CB com formato de esfera, produzidos após 48 h de polimerização.....63

Figura 10 - Espectros de Infravermelho com ATR obtidos para amostras biocompósitas.....65

Figura 11 - Micrografias de miliesferas e membranas de celulose bacteriana puras liofilizadas com ampliação de 1000×: A) Superfície externa da esfera. B) Superfície interna da esfera. C) Lado inferior da membrana. D) Lado superior.....68

Figura 12 - Micrografias das duas superfícies dos biocompósitos com formato de membrana produzidos após 24 horas de polimerização. As imagens A, B e C correspondem à mesma superfície com ampliações de 1000×, 5000× e 10000×, respectivamente. Por sua vez as imagens (D), (E) e (F) correspondem à superfície oposta nas mesmas ampliações. Pode-se visualizar que a superfície é mais densa num dos lados e que em ambos os casos as fibras de celulose ficaram bem distribuídas no biocompósito. ....69

Figura 13 - Micrografias dos biocompósitos com formato de esfera produzidos após 24 horas de polimerização. As imagens A, B e C correspondem ao corte transversal da amostra com diferentes ampliações. Por sua vez, as imagens (D), (E) e (F) correspondem à superfície externa dos biocompósitos em diferentes ampliações. Pode-se visualizar que a superfície externa é mais porosa.....69

Figura 14 - Curvas TG/DTG dos biocompósitos MB1 e MB2. A) Curva DTG para os bicompósitos com MB1 e MB2. B) Curva TG para os bicompósitos com MB1 e MB2.....71

Figura 15 - Curvas de DSC do 1° aquecimento dos biocompósitos MB1 e MB2. ....74

Figura 16 - Curvas de DSC do 2° aquecimento dos biocompósitos MB1 e MB2. ....74

Figura 17 - Determinação de degradação hídrica (%) de EB1 e EB2 com relação à massa seca (%) inicial. ....75

Figura 18 - Determinação de absorção hídrica com relação à massa seca. (A) EB1 e EB2. (B) CB-p. ....76



Figura 19 - Resultados de Ensaio de MTS dos biocompósitos produzidos. Celulose bacteriana pura (CB-p), membranas biocompósitas polimerizadas 24 h (MB1), membranas biocompósitas polimerizadas 48 h (MB2), esferas biocompósitas polimerizadas 24 h (EB1), esferas biocompósitas polimerizadas 48 h (EB2)..... 77

Figura 20 - Resultados de Ensaio de MTS. Os biocompósitos e o controle foram mantidos em meio de cultura DMEM por 24 horas antes de realizar o teste. Logo o meio de cultura foi trocado e os Fibroblastos L929 foram semeados e a leitura da absorbância foi feita 24 horas depois. .... 78



## **LISTA DE QUADROS**

|   |    |
|---|----|
| Quadro 1 - Comparativo entre atributos dos polímeros naturais e dos sintéticos com aplicação biomédica, (Sionkowska, 2011). ..... | 31 |
| Quadro 2 – Resultados obtidos para varredura de temperatura de polimerização.....   | 62 |



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CB – Celulose Bacteriana  
CB-p – Celulose bacteriana pura  
DMEM – em inglês, Dulbecco's modified Eagle's medium  
DSC – Calorimetria exploratória diferencial, em inglês Differential Scanning Calorimetry  
DTG – Curvas termogravimétricas derivadas, em inglês Differential Thermal Analysis  
EB1 – Esferas biocompósitas polimerizadas em 24 horas  
EB2 – Esferas biocompósitas polimerizadas em 48 horas  
FDA – em inglês, Food and Drug Administration  
FTIR – Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, em inglês Fourier Transform Infrared Spectroscopy  
GRAS – Geralmente reconhecido como seguro, em inglês Generally recognized as safe  
 $H_c$  – Entalpia de cristalização  
HIV – em inglês, Human Immunodeficiency Virus  
 $H_m$  – Entalpia de fusão  
InteLab – Laboratório de Tecnologias Integradas (UFSC)  
ISO – International Organization for Standardization  
LabMat – Laboratório de Materiais (UFSC)  
LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (UFSC)  
MB1 – Membranas biocompósitas polimerizadas em 24 h  
MB2 – Membranas biocompósitas polimerizadas em 48 h  
MC – Metil Celulose.  
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura  
MTS – [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio]  
 $M_w$  – Massa molar, em inglês Molecular Weight  
NC – Nanocristais de Celulose  
NFC – Nanofibras de Celulose  
PBS – Solução tampão fosfato  
PCL – Poli( $\epsilon$ -caprolactona)  
PEG – (polietilenglicol)  
PLA – Poli(Ácido Láctico) ou Poli(L-Lactide), em inglês (Poly(Lactic Acid) ou Poly(Lactide))  
PLGA – Ácido poli(láctico-co-glicólico), em inglês Poly(Lactic-co-glycolic acid)  
PLLA – Poli(L-Ácido Láctico) ou Poli(L-Lactide), em inglês (Poly(L-Lactic Acid) ou Poly(L-Lactide)).

ROP – Polimerização por abertura de anel, em inglês (Ring Opening Polymerization)

Sn(oct) – Octanoato de Estanho

$T_c$  – Temperatura de cristalização, em inglês (Crystallization temperature)

$T_g$  – Temperatura de Transição Vítreia, em inglês (Glass transition temperature)

TGA – Análise termogravimétrica, em inglês (Thermogravimetric Assay).

$T_m$  – Temperatura de fusão, em inglês (Melting point temperature)

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

Vitrocer – Laboratório de Materiais Vitrocerâmicos (UFSC)

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Codificação das amostras dos biocompósitos produzidos. ....  | 64 |
| Tabela 2 - Massas secas dos hidrogéis de celulose bacteriana com formatos de esfera e de membrana. ....                         | 64 |
| Tabela 3 - Proporção de fibras presentes nos biocompósitos de PLLA/CB. ....   | 64 |
| Tabela 4 - Atribuição dos picos de absorção de FTIR para controle de CB. ....   | 66 |
| Tabela 5 - Atribuição dos picos de absorção de FTIR para as amostras compósitas de PLLA-CB produzidas por policondensação. .... | 67 |
| Tabela 6 - Temperaturas de degradação térmicas obtidas por TGA. ....  | 72 |
| Tabela 7 - Temperaturas de transição vítrea e fusão dos biocompósitos PLLA/CB. ....   | 73 |





## SUMÁRIO

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | INTRODUÇÃO  | 25 |
| 2     | JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO TRABALHO   | 29 |
| 2.1   | MOTIVAÇÃO   | 29 |
| 2.2   | OBJETIVOS   | 29 |
| 2.2.1 | Objetivo Geral  | 29 |
| 2.2.2 | Objetivos Específicos   | 29 |
| 3     | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA   | 31 |
| 3.1   | CELULOSE BACTERIANA   | 33 |
| 3.2   | POLI(L-ÁCIDO LÁCTICO) (PLLA)  | 34 |
| 3.2.1 | Processo de polimerização   | 38 |
| 3.2.2 | Produção de PLA por meio da engenharia genética   | 43 |
| 3.3   | APLICAÇÕES NA ÁREA BIOMÉDICA  | 43 |
| 3.3.1 | COMPÓSITOS DE PLLA COM CB   | 46 |
| 4     | MATERIAIS E MÉTODOS   | 49 |
| 4.1   | PREPARAÇÃO DE HIDROGÉIS DE CELULOSE BACTERIANA  | 51 |
| 4.2   | DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE POLIMERIZAÇÃO E PRODUÇÃO DOS BIOCAMPÓSITOS                                   | 51 |
| 4.2.1 | Desidratação de L-ácido láctico   | 52 |
| 4.2.2 | Oligomerização  | 52 |
| 4.2.3 | Polimerização <i>in situ</i>  | 52 |
| 4.2.4 | Secagem das amostras  | 53 |
| 4.3   | CARACTERIZAÇÃO DOS BIOCAMPÓSITOS  | 54 |
| 4.3.1 | Microscopia eletrônica de varredura (MEV)   | 54 |
| 4.3.2 | Análise termogravimétrica (TGA)   | 54 |
| 4.3.3 | Calorimetria exploratória diferencial (DSC)   | 54 |
| 4.3.4 | Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com refletância atenuada (ATR) | 55 |
| 4.3.5 | Estudo de degradação hidrolítica  | 55 |
| 4.4   | ENSAIO DE CITOTOXICIDADE  | 56 |
| 5     | RESULTADOS E DISCUSSÃO  | 59 |
| 5.1   | DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE POLIMERIZAÇÃO  | 59 |
| 5.1.1 | Produção da celulose bacteriana   | 59 |
| 5.1.2 | Determinação da temperatura de polimerização  | 60 |
| 5.2   | PRODUÇÃO DOS BIOCAMPÓSITOS  | 62 |
| 5.2.1 | Desidratação e oligomerização do L-ácido láctico  | 62 |
| 5.2.2 | Polimerização <i>in situ</i>  | 63 |

|       |   |           |
|-------|---|-----------|
| 5.3   | CARACTERIZAÇÃO DOS BIOCOMPÓSITOS  | 65        |
| 5.3.1 | Interações Físico-Químicas nos Biocompósitos de PLLA-CB analisados por FTIR-ATR | 65        |
| 5.3.2 | Distribuição das fibras de celulose bacterina no biocompósito                   | 67        |
| 5.3.3 | Estabilidade térmica dos biocompósitos de PLLA-CB                               | 70        |
| 5.3.4 | Comportamento térmico dos biocompósitos   | 72        |
| 5.3.5 | Degradação hidrolítica  | 74        |
| 5.4   | CITOTOXICIDADE DOS BIOCOMPÓSITOS  | 76        |
| 6     | CONCLUSÕES  | 81        |
| 7     | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS  | 83        |
|       | <b>REFERÊNCIAS</b>  | <b>85</b> |
|       | <b>APÊNDICE A</b>   | <b>99</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos ou engenharia tecidual oferece uma alternativa ao tratamento de pacientes com órgãos e tecidos que apresentem mal funcionamento ou estejam comprometidos por patologias, traumas, lesões ou até mesmo senescência, permitindo que os tecidos possam ser regenerados a partir de células cultivadas num suporte polimérico (Cheng *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2012). Esse tipo de suporte, conhecido como *scaffold*, serve como substrato e como suporte físico para a aderência das células e como guia na formação dos novos tecidos ou órgãos, degradando-se enquanto estes são formados. Os avanços tecnológicos dos últimos anos nas áreas da medicina, engenharia e ciência dos materiais, possibilitou o desenvolvimento de materiais com as características necessárias para aplicações biomédicas (Gupta *et al.*, 2007; John *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2009; Jardini *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2012).

Os materiais usados em engenharia de tecidos devem ser biocompatíveis, biodegradáveis, de alta porosidade, com uma grande proporção superfície/volume para facilitar a adesão de células e promover seu crescimento, permitindo também a conservação das funções das células diferenciadas (Cheng *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2012). Por isso os materiais poliméricos biodegradáveis são preferidos para a construção de estruturas que mimetizam as estruturas vivas em forma e função, e ajudam na recuperação de tecidos danificados (Lasprilla *et al.*, 2012). Exemplos deste tipo de estrutura são: implantes, próteses temporárias, estruturas tridimensionais porosas como os *scaffolds*, assim como veículos de liberação e entrega de fármacos. Para cada tipo de aplicação são necessários materiais com propriedades físicas, químicas, biológicas, biomecânicas e de degradação específicas para fornecer uma terapia eficiente; daí o interesse em se estudar polímeros naturais ou sintéticos que apresentam essas características e sejam capazes de se degradar por via enzimática ou hidrolítica (Nair e Laurencin, 2007).

Os biomateriais de origem natural mais usados são proteínas ou polissacarídeos; enquanto, os de origem sintética incluem metais como o titânio e suas ligas, e cerâmicas como a hidroxiapatita e compósitos de polímeros biodegradáveis. Dos biomateriais de origem natural, um dos mais promissores é a celulose bacteriana (CB), um polissacarídeo excretado extracelularmente, produzido por diversas cepas de bactérias como a *Gluconacetobacter hansenii*. Ele possui propriedades físicas e

mecânicas únicas, morfologia tridimensional formada por uma rede de nanofibras, assim como um elevado grau de pureza, hidrofiliçidade e biocompatibilidade comparada à celulose vegetal (Da Silva, 2012). Este biopolímero tem sido amplamente utilizado na área biomédica para o desenvolvimento de pele artificial, vasos sanguíneos artificiais, enxertos vasculares e *scaffolds* para engenharia de tecidos. Os trabalhos desenvolvidos por Rambo e colaboradores (2008), Berti e colaboradores (2013) e Stumpf e colaboradores (2013), são alguns exemplos das aplicações da celulose bacteriana na área biomédica.

Dentre os materiais sintéticos, um dos mais relevantes é o poli(L-ácido láctico) ou PLLA, o qual é um polímero sintético que tem como monômero estrutural o ácido láctico. Este material é importante tanto para aplicação na indústria dos plásticos, como na área médica (Garlotta, 2001; Kaihara *et al.*, 2007), não só porque deriva de fontes renováveis e não tóxicas, mas também por ser biodegradável, bioabsorvível, de alta biocompatibilidade e de excelentes propriedades mecânicas (Wee *et al.*, 2006; Kaihara *et al.*, 2007). Suas aplicações clínicas são principalmente na fabricação de próteses e suturas cirúrgicas, assim como na elaboração de dispositivos de fixação de ossos e de “suportes” para entrega de fármacos (Gupta *et al.*, 2007; Jem *et al.*, 2010).

Nos últimos anos uma ampla variedade de biomateriais baseados na mistura de dois ou mais polímeros sintéticos e/ou naturais tem sido estudada. O intuito é gerar matrizes poliméricas com tamanhos de poros adequados, forma e propriedades mecânicas que possam mimetizar as propriedades de algum tecido em particular, ou para desenvolver suportes para a adesão e proliferação celular, ou para a liberação de fármacos,. O material resultante em geral apresenta características mecânicas, térmicas e de biocompatibilidade diferentes daquelas exibidas pelos seus componentes puros (Sionkowska, 2011).

A relação hidrofiliçidade/hidrofobicidade da superfície dos biomateriais influi fortemente na adesão e no crescimento celular. Desta forma, mesmo que o PLLA seja um material biodegradável e biocompatível, a natureza hidrofóbica da sua superfície afeta a adesão e o crescimento celular, pois a hidrofiliçidade exerce influência na citocompatibilidade dos biomateriais (Mikos *et al.*, 1994; Wang e Cai, 2007).

Nos últimos anos, as fibras naturais têm chamado a atenção como uma alternativa para desenvolver compósitos comerciais, já que oferecem vantagens como: sustentabilidade, obtenção através de fontes naturais, baixa densidade, biodegradabilidade e baixo custo.

O uso da celulose como reforço em compósitos oferece, entre outras vantagens, a possibilidade de fazer modificações químicas de sua superfície, devido à presença de grupos hidroxila, e de melhorar as propriedades mecânicas dos compósitos. O uso do PLLA como matriz para compósito tem sido amplamente pesquisado, sendo que várias tentativas para obter uma matriz de PLLA com celulose, tanto na forma de nanocristais de celulose (NC) como de nanofibras de celulose (NFC) têm sido reportadas; contudo, há poucos estudos sobre matrizes de PLLA combinadas com CB (Frone *et al.*, 2011).

Por serem polímeros de natureza hidrofóbica e hidrofílica, respectivamente, um biocompósito formado por PLLA e CB podem levar à geração de uma nova gama de materiais poliméricos biodegradáveis. Por esses motivos, vários pesquisadores têm visualizado sua aplicação em diversas áreas tecnológicas, além da área biomédica, por exemplo como material de embalagens, de revestimento e para a fabricação de lentes de contato (Petinakis *et al.*, 2013; Raquez *et al.*, 2013).

Por seus atributos individuais, os dois biopolímeros (CB e PLLA), apresentam um grande potencial para aplicações biomédicas, o que impulsiona o interesse pelo desenvolvimento de um biocompósito que reúna tanto as características da CB quanto as do PLLA.



## **2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO TRABALHO**

### **2.1 MOTIVAÇÃO**

A motivação para o presente trabalho, leva em consideração os seguintes pontos:

- Há poucos trabalhos reportados na literatura referentes ao desenvolvimento de matrizes de PLLA com CB;
- Produzir um biocompósito com PLLA e CB, e conseguir que a matriz apresente uma boa dispersão das nanofibras de celulose bacteriana é uma passo importante para o desenvolvimento desses biocompósitos devido à natureza hidrofílica da celulose e a natureza hidrofóbica de PLLA;
- Os hidrogéis de CB são 99% água, enquanto ácido láctico e o lactídeo (monômeros do PLLA) podem ser dissolvidos no hidrogel de CB;
- É possível produzir o PLLA por policondensação do ácido láctico, a vácuo sem uso de catalisadores, solventes ou iniciadores (Achmad *et al.*, 2009).

### **2.2 OBJETIVOS**

#### **2.2.1 Objetivo Geral**

Produzir biocompósitos de PLLA e CB por meio da polimerização do PLLA *in situ* no interior do hidrogel de CB pelo método de policondensação direta sem uso de catalisadores.

#### **2.2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar a temperatura na qual podem ser produzidos os biocompósitos.

- Gerar os biocompósitos de PLLA/CB produzindo o polímero dentro do hidrogel de celulose bacteriana sem utilizar catalisadores de qualquer natureza.
- Caracterizar os biocompósitos produzidos.
- Avaliar a citotoxicidade dos biocompósitos desenvolvidos.



### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A fim de se obter materiais com propriedades térmicas e mecânicas diferentes, capazes de serem utilizados para novas aplicações, nos últimos anos tem sido estudada e desenvolvida uma ampla variedade de biomateriais baseados na mistura de dois ou mais polímeros sintéticos e/ou naturais (Sionkowska, 2011). A mistura desses materiais gera um novo material que apresenta características mecânicas, térmicas e de biocompatibilidade diferentes daquelas exibidas pelos seus componentes puros. O Quadro 1 apresenta um comparativo entre os atributos dos polímeros naturais e sintéticos em aplicações biomédicas. Na área biomédica, novos materiais vêm sendo desenvolvidos com o objetivo principal de gerar matrizes poliméricas para o desenvolvimento de *scaffolds* ou suportes destinados à entrega de fármacos (Cheng *et al.*, 2009; Sionkowska, 2011; Lopes *et al.*, 2012).

Quadro 1 - Comparativo entre atributos dos polímeros naturais e dos sintéticos com aplicação biomédica, (Sionkowska, 2011).

| Atributos                     | Polímeros Naturais   | Polímeros Sintéticos   |
|-------------------------------|--|--|
| <b>Biocompatibilidade</b>     | Biocompatíveis   | Biocompatíveis, porém podem conter resíduos de iniciadores, impurezas ou catalisadores que impedem o crescimento celular |
| <b>Propriedades mecânicas</b> | Menores comparadas com os materiais sintéticos; apresentam limitações de forma | Melhores comparadas com os polímeros naturais; podem ser processados em uma ampla variedade de formas                    |
| <b>Propriedades térmicas</b>  | Temperaturas elevadas podem destruir sua estrutura                             | Maior resistência às temperaturas elevadas   |

De acordo com a literatura, para que um material sintético ou natural seja classificado como biomaterial ele deve ser biocompatível, biofuncional, poroso, possuir uma superfície apropriada para a adesão celular e ser capaz de promover a produção da matriz extracelular circundante (Da Silva, 2012). Estas características permitem ao material ser utilizado em dispositivos médicos ou em dispositivos que permanecerão em contato direto com os tecidos vivos. Isto também

possibilita a sua utilização sem causar danos ao organismo, propiciando respostas celulares e teciduais benéficas para o paciente (Santos, 2011).

Por sua vez, um compósito consiste em pelo menos dois tipos de materiais individuais onde um atua como matriz e o outro como material de reforço. Quando se fala de um material biocompósito, em geral significa que tanto a matriz quanto o reforço são obtidos a partir de fontes renováveis. A matriz suporta o reforço; por sua vez, o reforço dá à matriz novas propriedades físico-químicas e biológicas. A sinergia formada entre a matriz e o reforço gera um material com propriedades mecânicas e físicas que são diferentes das dos materiais que o constituem de forma individual. Uma vez que existe uma grande variedade de matrizes e reforços naturais, torna-se possível a síntese de uma variedade de materiais biocompósitos com propriedades otimizadas (Yu *et al.*, 2010; Reddy *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2013).

Um biocompósito pode ser classificado em vários subgrupos de materiais, dependendo dos tipos de materiais que o constituem, se são de origem natural ou sintética, sua escala e a combinação de materiais utilizada.

Segundo Raquez e colaboradores (2013), quando se fala de nanocompósitos poliméricos, trata-se de materiais de múltiplas fases, sendo que ao menos uma das fases, geralmente o suporte, apresenta ao menos uma dimensão na escala nanométrica. Para a preparação de nanocompósitos poliméricos, existem quatro rotas principais: a) método de solução, no qual o polímero é dissolvido no solvente adequado junto com partículas em escala nanométrica, logo, o solvente é evaporado ou precipitado; b) mistura em fusão, neste caso o polímero é fundido e misturado diretamente com as nanopartículas; c) polimerização *in situ*, no qual as nanopartículas são dispersas primeiro no monômero líquido ou em solução monomérica seguida de um processo de polimerização, e d) a síntese de molde, no qual as nanopartículas são sintetizadas a partir de solução de precursor.

Outra classificação dos materiais pode ser feita quando estes são utilizados em implantes. Segundo Dos Santos (2011), no caso dos biomateriais que são utilizados em implantes, primeiro deve ser considerado se o implante será permanente ou temporário. Desta forma, neste tipo de aplicação os materiais utilizados são classificados como: biodegradáveis, bioabsorbíveis, bioinertes e bioativos. Os materiais biodegradáveis sofrem degradação macromolecular ao longo do tempo e são dispersos *in vivo*, mas não são eliminados do organismo. Por sua vez, os bioabsorbíveis se degradam em moléculas menores possibilitando que os subprodutos sejam eliminados através do ciclo

celular. Já os materiais bioinertes são materiais biologicamente inativos que favorecem a formação de uma cápsula fibrosa ao seu redor. Os materiais bioativos favorecem ligações na interface do implante e o tecido, possibilitando a classificação de três tipos de interações: fixação morfológica, fixação biológica e fixação bioativa, ou seja, crescimento de tecido ao redor do implante, crescimento do tecido dentro dos poros do biomaterial ou a formação de uma interface contínua com o tecido.

A obtenção de blendas é provavelmente o método mais utilizado para modificar as propriedades mecânicas do biomaterial. Blendas têm sido desenvolvidas com plastificantes e polímeros tanto biodegradáveis quanto não biodegradáveis. As principais modificações visam controlar a hidrofiliabilidade, rugosidade e introduzir grupos reativos; estes últimos são benéficos para aplicações biomédicas, enquanto que as melhorias nas velocidades de degradação são importantes tanto para aplicações biomédicas quanto para outras aplicações comerciais (Rasal *et al.*, 2010).

### 3.1 CELULOSE BACTERIANA

A celulose bacteriana (CB) é um polissacarídeo natural produzido por diversas cepas de bactérias capazes de sintetizá-la em sua membrana e depois secretá-la formando um hidrogel de CB. São diversas as bactérias capazes de produzir CB, porém, as da linhagem *Gluconacetobacter hansenni* e *xylinum* são as únicas capazes de produzi-la em escala comercial. Para a sua produção, existem dois métodos de cultura: estático e agitado (Watanabe *et al.*, 1998; Gea *et al.*, 2011; Dayal *et al.*, 2013). Em ambos os casos, obtém-se um polímero de elevada pureza, pois a CB está constituída unicamente por celulose e água e está livre de lignina e hemicelulose. Além disso, apresenta alto grau de polimerização, exhibe também um elevado módulo de tração e elasticidade, assim como elevada capacidade de absorção de água, sendo que aproximadamente 99% do seu volume está constituído de líquido, é facilmente moldável, apresenta cristalinidade de 60 a 80%, e é não-alérgica e atóxica (Klemm *et al.*, 2005; Bäckdahl *et al.*, 2006; Berti *et al.*, 2013; Stumpf *et al.*, 2013).

Nas condições de cultura estática, estas bactérias produzem uma rede tridimensional de nanofibras de celulose na interface ar-líquido do meio de cultura. A estrutura tridimensional formada está constituída por uma rede de nanofibras de celulose, sendo que esta rede é feita por um arranjo aleatório que forma feixes relativamente retos, contínuos e de dimensões uniformes (Watanabe *et al.*, 1998; Raquez *et al.*, 2013).

Cabe ressaltar que a película de CB (membrana) formada na interface entre o meio de cultivo e o ar em condições estáticas apresenta duas superfícies com microestruturas distintas. Segundo Bäckdahl e colaboradores (2006), a membrana de CB formada na interface com o ar possui uma superfície formada por um arranjo altamente denso de nanofibras de CB (lado denso) e a outra superfície possui um arranjo anisotrópico e poroso de nanofibras de CB (lado poroso).

Quando a cultura é conduzida em condições de agitação, é possível a produção de hidrogéis de CB com formatos variados, os quais incluem fibras, *pellets*, esferas e massas irregulares (Gu e Catchmark, 2012). Tem-se demonstrado que sobre certas condições de cultura, cepas de *Gluconacetobacter hansenni* (ATCC 23769) e *xylum* (ATCC 700178) podem produzir esferas de CB isoladas no meio de cultura. É importante levar em consideração que em uma cultura em agitação, a quantidade de oxigênio dissolvido e as forças de cisalhamento atuam sobre a superfície da esfera enquanto esta está sendo formada, afetando a estrutura e o tamanho do hidrogel final (Hu e Catchmark, 2010). Watanabe e colaboradores (1991), avaliaram a estrutura e as propriedades da CB produzida em condições de cultura estáticas e agitada, observando que a diferença é praticamente nula entre a estrutura reticulada das fibras de celulose produzidas em cultura estática e agitada, mas há um menor grau de polimerização e cristalinidade na CB produzida em agitação.

Por suas características intrínsecas, a CB tem aplicações em diversas áreas tecnológicas. Estas incluem a indústria de alimentos, têxtil e a área biomédica, sendo que nesta última tem se potencializado sua aplicação no desenvolvimento de pele artificial, vasos sanguíneos artificiais, enxertos vasculares e suportes para engenharia de tecidos (Fu *et al.*, 2013; Ruka *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2013).

### 3.2 POLI(L-ÁCIDO LÁCTICO) (PLLA)

Quanto ao PLA, trata-se de um poliéster alifático derivado de fontes renováveis, biodegradável, de alta biocompatibilidade, bioabsorvível, de baixa toxicidade e boas propriedades mecânicas (Drumright *et al.*, 2000; Lasprilla *et al.*, 2012). O termo PLA inclui um conjunto de polímeros: o poli-L-ácido láctico puro ou PLLA, formado unicamente pelo isômero L- do ácido láctico, o poli-D-ácido láctico puro ou PDLA, formado pelo isômero D, e o poli-D-L-ácido láctico ou PDLLA, formado por ambos isômeros estruturais (Griffith, 2000). Segundo Jahno (2005), para diferenciar o processo de síntese, o

polímero obtido diretamente a partir do ácido láctico é denominado poli(ácido láctico) e quando o dímero lactídeo é utilizado como monômero de partida, o polímero é chamado poli(lactídeo); contudo, ambos apresentam a mesma fórmula estrutural.

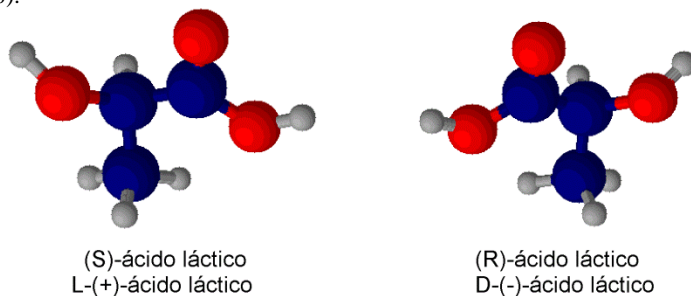
O PLA de baixa massa molar foi sintetizado pela primeira vez em 1932. Em 1954, a empresa Dupont produziu e patenteou este polímero com alta massa molar. O primeiro sucesso comercial dos polímeros a base de ácido láctico foi como fibras para suturas reabsorbíveis; a partir de então, uma série de dispositivos protéticos foram desenvolvidos (Gupta *et al.*, 2007; Rasal *et al.*, 2010; Lasprilla *et al.*, 2012). Atualmente, existem disponíveis no mercado polímeros de massa molar de 2.000 a 300.000 g·mol<sup>-1</sup>, sendo que os de baixa massa molar são utilizados para desenvolver matrizes para entrega de fármacos; já os de elevada massa molar geralmente são usados em processos de osteossíntese (Siqueira, 2011).

Para a síntese do PLA, utiliza-se como monômero estrutural o ácido láctico ou o ácido 2-hidroxipropiônico. Trata-se de um ácido não volátil, inodoro, solúvel em água e de alto grau de higroscopicidade. Ele é usado amplamente na indústria de alimentos e bebidas como aditivo, agente acidulante, flavorizante, regulador de pH ou como inibidor de proliferação de microrganismos por possuir classificação GRAS, outorgada pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos (Naveena *et al.*, 2005; Wee *et al.*, 2006). É classificado como o hidroxiácido mais simples e está presente em quase todas as formas de vida organizada. De acordo com Reddy e colaboradores (2008), ele supre energia aos tecidos musculares em animais e humanos, sendo esta uma das suas funções fisiológicas mais importantes, pois é capaz de permear a membrana lipídica; uma vez dentro da célula, é convertido em glicose. Além disso, apresenta propriedades antioxidantes, protegendo a célula de danos dos radicais livres produzidos ao longo do seu ciclo de vida (Philp *et al.*, 2005; Lampe *et al.*, 2009).

A molécula de ácido láctico possui um grupo funcional hidroxila, um grupo ácido e um carbono assimétrico (quiral). Devido ao fato de possuir um carbono quiral, permite a existência de duas formas opticamente ativas desta molécula (Figura 1). Portanto, existem dois enantiômeros desta molécula, o L- e D-ácido láctico, os quais apresentam efeitos diferentes quando são analisados sobre a luz polarizada, sendo que o L-ácido láctico faz a luz polarizada girar à direita sobre o plano, enquanto o isômero D gira a luz no sentido inverso. Há também uma forma opticamente inativa, conhecida como D, L, ou meso, a qual consiste em uma mescla racêmica dos isômeros (Garlotta, 2001; Gupta

*et al.*, 2007). Cabe ressaltar que a maior parte do ácido láctico de origem biológica existe na forma do isômero L-, por ser este isômero um metabólito biológico de ocorrência natural no corpo humano, sendo esta a principal razão pela qual o L-ácido láctico é o isômero usado nas indústrias de alimentos e farmacêutica (Wee *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2008).

Figura 1 - Moléculas de L- e D-ácido láctico. Adaptado de Jem e colaboradores (2010).



Entre as vantagens do uso do PLLA, inclui-se o fato de ser um material ecologicamente amigável (Rasal *et al.*, 2010), que não produz efeitos tóxicos ou carcinogênicos em tecidos quando implantado *in vivo* (Athanasίου *et al.*, 1996; Rasal *et al.*, 2010), apresenta a característica de poder ser moldado mediante os mesmos processos utilizados no molde de polímeros de origem química (Lim *et al.*, 2008) e, diferentemente destes últimos, precisa de menos energia para ser produzido (Vink *et al.*, 2003).

Dentro das limitações, podem-se incluir a baixa resistência a deformações devido a que se trata de um material rígido e quebradiço (Rasal e Hirt, 2009; Hassouna *et al.*, 2011). Este polímero degrada por meio da hidrólise de grupos éster. Uma vez que a taxa de degradação depende da massa molar, que trata-se de um polímero de elevada cristalinidade e que a degradação depende também da morfologia, da taxa de difusão da água para o polímero, o PLLA apresenta tempos de degradação prolongados *in vivo* (Janorkar *et al.*, 2004). Outra limitante é a baixa afinidade celular causada pela hidrofobicidade do material, assim como não ter grupos reativos na cadeia lateral, o que impede modificações de sua superfície (Ratner, 1995).

Por estes motivos, Rasal e colaboradores (2010) afirmam que para se ter sucesso na utilização de PLA, tanto em *commodities* quanto em biomateriais, é necessário controlar as propriedades da superfície do

material, assim como as propriedades mecânicas, o que tem levado a modificações das propriedades de resistência e velocidades de degradação por meio da modificação das massas molares.

As propriedades mecânicas e o comportamento cristalino deste material são dependentes dos isômeros que o compõem, massa molar, tratamento térmico e temperatura do processo, entre outros (Madhavan Nampoothiri *et al.*, 2010).

O PLA pode ser cristalizado em três formas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), dependendo se está composto pelo enantiômero L- ou D- (Lim *et al.*, 2008) e da proporção de cada monômero. Assim, PLA composto por mais de 90% de isômero L- tende a ser cristalino e pode atingir um grau de cristalinidade acima de 40 % tendendo a ser cada vez mais amorfo conforme aumenta a quantidade de impurezas presentes no material, ou seja, o material é mais amorfo ao ser menos opticamente puro (Hirata e Kimura, 2010).

Uma das propriedades do PLA que é afetada dependendo se o material é amorfo ou cristalino é a massa específica do polímero; por exemplo, o PLLA amorfo apresenta uma massa específica de  $1,248 \text{ g mL}^{-1}$ . Por sua vez, o PLLA cristalino exibe uma massa específica de  $1,290 \text{ g mL}^{-1}$ , segundo dados compilados por Lopes e colaboradores (Lopes *et al.*, 2012).

Por sua vez, as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) e temperatura de fusão ( $T_m$ ) variam conforme a cristalinidade do material, abrangendo uma faixa que parte de 50 a 80 °C e de 130 a 180 °C, respectivamente (Auras *et al.*, 2004; Peres, 2012). Das propriedades do material, as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) e de fusão ( $T_m$ ) têm um papel fundamental no processamento, pois um dos parâmetros mais importantes para o PLA amorfo é a temperatura de transição vítrea, já que ocorrem trocas importantes na cadeia do polímero a temperaturas acima da  $T_g$ . No caso do PLA semicristalino, as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) e de fusão ( $T_m$ ) são parâmetros fundamentais para prever o comportamento do material (Lopes *et al.*, 2012). Por exemplo, quando o PLA é utilizado em dispositivos de liberação de fármacos, as propriedades como a  $T_g$ ,  $T_m$  e temperatura de cristalização ( $T_c$ ) podem afetar as taxas de liberação e de degradação do polímero.

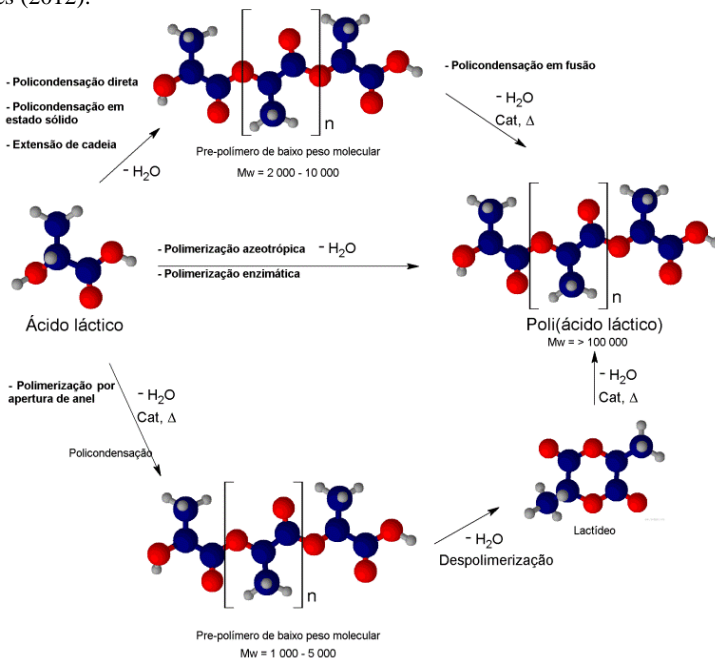
Serra e colaboradores (2014) produziram compósitos de PLA/polietilenglicol (PEG) para avaliar o efeito plastificante do PEG sobre blendas de PLA usado para a fabricação, através de impressão 3D, de *scaffolds* para aplicações de engenharia de tecidos. Os plastificantes são utilizados para diminuir a temperatura de transição vítrea, incrementar a ductibilidade e melhorar a processabilidade do PLA. Serra

e colaboradores (2014), observaram uma diminuição da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) quando incrementaram a concentração de PEG na blenda polimérica. O valor da  $T_g$  diminuiu de 59,19 °C para 15,34 °C ao incrementar a concentração de PEG de 0 a 20 % (m/m), respectivamente. Valores de  $T_g$  mais baixos também sugerem maior mobilidade das cadeias poliméricas.

### 3.2.1 Processo de polimerização

Devido à biofuncionalidade da molécula de ácido láctico, o PLA pode ser sintetizado por diversos métodos, tais como: reação de policondensação, polimerização por abertura de anel, desidratação azeotrópica e polimerização enzimática, como mostra a Figura 2. Recentemente, o homopolímero PLA e seu copolímero, o poli(3-hidroxiбутirato-co-lactato), foram produzidos em uma única etapa em bactérias *Escherichia coli* através da modificação genética de suas vias metabólicas (Jung *et al.*, 2010).

Figura 2 - Métodos de síntese de poli(ácido láctico). Adaptado de: Garlotta (2001) e Lopes (2012).





Devido ao ácido láctico apresentar os grupos funcionais hidroxila e carboxila, é possível convertê-lo diretamente a um poliéster pelo método de policondensação, mas sem atingir massas molares elevadas. Assim sendo, esta é uma das razões pela qual os métodos mais utilizados são a polimerização direta e a abertura de anel, com as quais se atingem elevadas massas molares (Garlotta, 2001; Lim *et al.*, 2008; Madhavan Nampoothiri *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2012).

### 3.2.1.1 Policondensação direta

A policondensação direta inclui a policondensação em solução e a policondensação em fusão. Na primeira, o ácido láctico, catalisador e solvente de elevado ponto de ebulição são misturados no reator. A reação é conduzida a 140 °C por duas horas. Depois disso, água e solvente são evaporados, e o polímero produzido é desidratado. No caso da policondensação no estado fundido, a temperatura da reação é maior do que a temperatura de fusão do PLLA (Cheng *et al.*, 2009). Segundo Auras e colaboradores (2010), o processo de polimerização ocorre em três estágios: remoção de água livre, policondensação do oligômero, e condensação em emulsão de PLA de elevada massa molar. Neste tipo de polimerização, há duas reações de equilíbrio: a primeira é a reação de policondensação em si, na qual há formação de uma molécula de água para cada duas moléculas de ácido láctico que reagem entre si; desta forma, a remoção de água é o fator limitante para o primeiro, e o último estágio do processo é a reação química, limitante para a segunda etapa. Segundo Moon e colaboradores (2001), Mehta e colaboradores (2005) e Auras e colaboradores (2010), é possível que ocorram reações secundárias, por exemplo, reações de transesterificação que levam à formação de estruturas aneladas como o lactídeo. Isso pode prejudicar as propriedades finais do material; mas, ao não ser possível eliminar este tipo de reações, deve-se controlar a seleção do catalisador e as condições de processo.

Deve-se ressaltar que a formação de água resulta na despolimerização das cadeias, fazendo-se necessário impedir que a água do meio ocasione a despolimerização para favorecer a polimerização no sentido da formação do polímero, já que o equilíbrio entre o ácido livre, os oligômeros e a água produzida na reação por este método, leva à obtenção de um polímero de baixa massa molar. Uma vez que o polímero resultante deste tipo de polimerização é mais frágil e quebradiço, torna-se necessária a utilização de agentes extensores de cadeia, a fim de aumentar sua massa molar. Contudo, este método utiliza menos etapas de processo, apresentando menor custo de

produção (Moon *et al.*, 2000; Garlotta, 2001; Almenar e Auras, 2010; Madhavan Nampootheri *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2012).

Para a obtenção do produto final pode ser utilizada uma quarta etapa, na qual o PLA policondensado em emulsão é resfriado abaixo de sua temperatura de fusão, o que leva à formação de partículas que depois são submetidas a um processo de cristalização. Com a finalidade de alcançar altas massas molares, é preciso fazer uma extensão da cadeia, onde o produto intermediário é tratado com extensores de cadeia que se ligam ao pré-polímero de baixa massa molar (Gu *et al.*, 2008), resultando num polímero complexo de alta massa molar e livre de solventes (Almenar *et al.*, 2010). Neste procedimento, os solventes e/ou catalisadores são utilizados em alto vácuo e temperatura para remover a água produzida durante a condensação, principalmente quando a reação é conduzida numa temperatura inferior à temperatura de evaporação da água (Gupta *et al.*, 2007; Siqueira, 2011).

Diversos estudos têm sido conduzidos para se obter PLLA por meios deste método. Kim e colaboradores (2002) realizaram um estudo para obter poli L-ácido láctico de elevada massa molecular, por policondensação direta, centrando-se na otimização das condições de polimerização, tais como o tempo de polimerização, solvente e os tipos de catalisador. Como resultado de sua pesquisa, obtiveram PLA de massa molar média viscosa ( $\bar{M}_v$ ) máximo de cerca de  $33.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , através deste método, utilizando uma temperatura de  $138 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 48-72 h, assim como um agente de secagem, e m-xileno como solvente. Por sua vez, Siqueira (2011) utilizou DL-lactídeo como monômero para obter pela via da policondensação um polímero de  $1.142 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  a uma temperatura de  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ , após 77 h de reação, sem uso de catalisadores. Seu resultado foi comparado com o obtido utilizando 0,5 % de Lipase B como catalisador, nas mesmas condições antes descritas; com isto obteve um polímero de massa de  $1.719 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , o que mostra que a via da policondensação pode ser mais eficiente comparada à via enzimática quando é utilizada Lipase B como catalisador.

Quando o processo é conduzido sem o uso de solventes (em massa), tem-se a desvantagem de se tornar mais difícil distribuir a temperatura de maneira uniforme no meio reacional, já que como foi ressaltado por Canavarolo Jr. (2004), a reação de formação é exotérmica, o que leva à geração de calor, numa taxa de  $20 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , ou seja, podem ser gerados pontos quentes dentro do reator, trazendo como consequência a instabilidade no crescimento da cadeia e levando a um aumento na velocidade de término; isto faz com que se forme um polímero com uma distribuição larga de massa molar.

Achmad e colaboradores (2009) produziram PLA por policondensação direta de L-ácido láctico em condições de vácuo, sem uso de catalisadores, solventes ou iniciadores, testando temperaturas de polimerização na faixa de 150 a 250 °C. A massa molar máxima obtida foi de 90.000 g mol<sup>-1</sup>, após 89 h de polimerização em condições de vácuo (10 mmHg), a 200 °C. Segundo os autores, este tipo de metodologia pode ter aplicação em instalações de produção nos quais são necessários sistemas de operação mais simples, seguros e compactos (Achmad *et al.*, 2009).

### 3.2.1.2 Polimerização por Abertura de Anel

Este tipo de polimerização, conhecido na literatura como ROP, do inglês *Ring Opening Polymerization*, é o mais empregado para obter elevadas massas molares e ocorre com a abertura do anel do dímero cíclico do ácido láctico (lactídeo) em presença de um catalisador. O processo ocorre em três estágios: policondensação, despolimerização e polimerização por abertura do anel (Södergård e Stolt, 2010).

O lactídeo pode ser obtido pelo método de descompressão, no qual a água é separada do sistema e, posteriormente, é adicionado um catalisador no reator. Após uma reação de várias horas, o lactídeo é obtido, abrindo seu anel para polimerizar (Cheng *et al.*, 2009).

Segundo Kim e colaboradores (2004, 2009), é possível obter PLA com massa molar controlada através da polimerização catalisada do lactídeo, intermediário por abertura de anel. Também é possível controlar a relação e a sequência de unidades de D- e L-ácido láctico no polímero final somente controlando o tempo de residência e a temperatura (Gupta *et al.*, 2007), para obter a proporção e distribuição desejada dos monômeros.

De acordo com Lopes e colaboradores (2012), este tipo de polimerização pode ser conduzido em emulsão, massa ou solução, sendo possível utilizar catalisadores aniônicos, catiônicos ou por mecanismos de inserção coordenada, dependendo do tipo de catalisador utilizado. Este tipo de processo requer etapas de purificação, as quais são complexas e caras (Garlotta, 2001; Mehta *et al.*, 2005; Mehta *et al.*, 2007).

O catalisador mais empregado é o octanoato de estanho, pois pode atingir altas velocidades de reação, altas conversões e alta massa molar (Mehta *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2007).

### 3.2.1.3 Desidratação Azeotrópica

Consiste em um método direto, que permite obter altas massas molares, no qual é relativamente simples remover a água formada no meio de reação (Garlotta, 2001). Este método segue as principais etapas da policondensação direta em emulsão, com a diferença de que a última etapa de emulsão/policondensação não é necessária, pois a policondensação é feita em solução. Outra diferença é a necessidade de usar um agente secante para retirar a água produzida durante a reação. Este método apresenta a desvantagem de que, ao usar ácidos orgânicos na reação de desidratação, o polímero preparado deve ser coletado do solvente, dificultando o processo, aumentando o tempo de produção e diminuindo o rendimento das matérias primas. Para este tipo de polimerização, os catalisadores de estanho têm sido os que atingiram melhores resultados (Södergård *et al.*, 2010).

### 3.2.1.4 Polimerização enzimática

Segundo Cheng e colaboradores (2009), este método além de ser ambientalmente correto, é um dos mais viáveis e ocorre em condições simples com controle adequado da polimerização. Diferentemente dos catalisadores químicos, as enzimas permitem processos de polimerização em faixas menores de pressão, temperatura e pH. Já que se trata de substâncias não tóxicas, possibilitam a obtenção de um material sem metais (Siqueira, 2011).

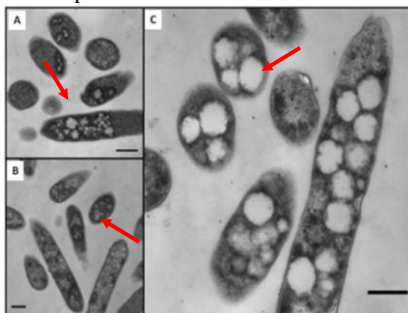
De acordo com os conceitos de Dubois e colaboradores (2009) e Siqueira (2011), as enzimas pertencentes aos grupos oxidoredutases, transferases e hidrolases são enzimas capazes de induzir ou catalisar a polimerização *in vitro*. Na célula, as hidrolases hidrolisam os ésteres de ácidos graxos na interfase água-lipídio. As lipases pertencentes a este grupo podem catalisar a formação de ligações éster, sendo que estas enzimas têm sido empregadas nas pesquisas de síntese de poliéster por policondensação e abertura de anel *in vitro*, sem a utilização de outro catalisador.

Siqueira (2011) fez um estudo das técnicas existentes para a síntese do PLA e o fez a partir de uma via química, utilizando octanoato de estanho,  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ , como catalisador, e outra enzimática utilizando o biocatalisador Lipase B. O PLA obtido a partir da rota química atingiu massa molar equivalente a  $8.353 \text{ g mol}^{-1}$  após 7 h de reação a  $160 \text{ }^\circ\text{C}$ , com 0,1 % de  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ . Para a rota enzimática, encontrou-se que a policondensação foi mais eficaz em relação à técnica de abertura de anel do lactídeo, obtendo um polímero com massa molar igual a  $1.719 \text{ g mol}^{-1}$  depois de 77 h de reação, a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ , com 0,5 % de Lipase B.

### 3.2.2 Produção de PLA por meio da engenharia genética

Baseando-se em uma simulação *in silico* em escala genômica, Jung e colaboradores (2010) engenheiraram as vias metabólicas de *E. coli* para fazê-la capaz de produzir polímeros de origem não natural. Esta modificação genética permitiu a produção do homopolímero de PLA e seu copolímero, o poli(3-hidroxi-butilato-co-lactato) P(3HB-co-LA), intracelularmente (Figura 3) de forma eficiente. A produção foi feita a partir de biomassa, através de um processo de fermentação direta, ou seja, uma produção em uma etapa apenas, estando disponíveis na célula os precursores para a síntese destes biomateriais.

Figura 3 - Micrografias eletrônicas de transmissão de grânulos intracelulares de homopolímero de PLA e do copolímero P(3HB-co-LA) acumulados em células de *E. coli* recombinante. A: Grânulos de homopolímeros de PLA acumulados na linhagem recombinante expressando JLX7 e Pct532Cp PhaC1400Ps6-19. B: Grânulos de homopolímeros de PLA acumulados na linhagem recombinante expressando JLX10 e Pct540Cp PhaC1310Ps6-19. C: P(3HB-co-55 mol% LA) copolímero acumulado na linhagem recombinante expressando JLX10 PhaC1310Ps6-19 e Pct540Cp. Barras de escala: 500 nm. Fonte: Jung (2010).



### 3.3 APLICAÇÕES NA ÁREA BIOMÉDICA

Como mencionado previamente, por sua biocompatibilidade e suas propriedades mecânicas, o PLA tem aplicações biomédicas como suturas cirúrgicas, materiais para fixação de ossos, microesferas para a liberação de fármacos e na engenharia de tecidos, e é amplamente estudado para desenvolver novas aplicações no campo da medicina (Lopes *et al.*, 2012). Na área biomédica, ele é usado tanto na forma de homopolímero quanto copolimerizado com monômeros do tipo lactonas ou com grupos funcionais como amino e carboxila, entre outros (Lasprilla *et al.*, 2012). Os polímeros utilizados para dispositivos biomédicos implantados cronicamente devem ser estáveis no meio biológico, de modo que o dispositivo desempenhe a sua função por um período prolongado de tempo (anos). Por outro lado, os polímeros para

aplicações de liberação de fármacos podem necessitar de tempos de degradação de alguns dias ou meses. Em suportes poliméricos utilizados em implantes de engenharia de tecidos, pode ser necessário que a degradação do material seja num período de tempo comparável aos tempos dos processos de regeneração do tecido particular, que são geralmente de semanas ou meses (Adamus *et al.*, 2012).

Rasal e colaboradores (2009) fizeram uma adaptação dos dados compilados por Athanasiou e colaboradores (1996) para gerar uma tabela com os resultados dos testes de biocompatibilidade *in vivo* de dispositivos feitos com PLA. A compilação inclui testes de suturas, reparação óssea de fraturas, implantes subcutâneos, e entrega de fármacos, implantes para reparo de defeitos osteocondrais. Seus resultados reportam que, com exceção de um caso onde se apresentou uma leve reação à presença do corpo estranho, não houve reações adversas ou reações inflamatórias.

As inovações modernas nos materiais, incluindo técnicas de nanotecnologia e as tecnologias de processamento têm gerado um efeito sinérgico no desenvolvimento e sínteses de sistemas de entrega de fármacos cada vez mais eficientes, pois permitem controlar o tamanho e a multifuncionalidade destes sistemas (Zhang *et al.*, 2013). No artigo de Zhang e colaboradores (2013) é apresentada uma relação dos sistemas de liberação de fármacos disponíveis no mercado, aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) até 2012; nesta lista incluem-se diversas blendas de PLA.

Para a liberação de fármacos, o PLA apresenta a vantagem de poder ser moldado em relação à massa molar e em proporção aos copolímeros e blendas de modo que pode oferecer uma liberação contínua do fármaco por períodos variáveis de tempo (Ratajczak-Enselme *et al.*, 2009). Neste sentido, tem-se obtido bons resultados utilizando microesferas de poli(D,L-ácido láctico) para aplicações de vacinas, peptídeos, proteínas e micromoléculas. Exemplo disso é o caso da liberação lenta e de longa duração de adriamicina para o combate do câncer (Ike *et al.*, 1991), a liberação de antirretrovirais para combate ao HIV (Dev *et al.*, 2010), assim como a liberação de plasmídeos para terapia gênica (Diez e De Ilarduya, 2006; Liu *et al.*, 2011).

Em 2012, foi reportado por Kemala e colaboradores o preparo de microesferas de poli(ácido láctico) (PLA) e poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) usando álcool polivinílico como emulsificante, pelo método de evaporação por solvente, com um diâmetro de aproximadamente 70  $\mu\text{m}$ . Os resultados desse trabalho mostraram que nas microesferas, a blenda

de PLA e PCL se formou unicamente por interações físicas entre os polímeros e que, usando uma relação PLA-PCL de 50 a 150 mL de cada um, com 2,5 % de emulsificante, produziram-se microesferas de tamanho e aparência uniforme, em ensaios em triplicata.

O PLA de alta massa molar pode ser utilizado para fabricar aparelhos ortopédicos, visando a reparação de defeitos ósseos ou fraturas (Lasprilla *et al.*, 2012). Uma vez colocado o implante de prótese, não é necessário realizar uma segunda cirurgia para remover o dispositivo, pois tem a vantagem de ser bioabsorvível (Middleton e Tipton, 2000).

Exemplos desta aplicação são o poli(85L,15D-ácido láctico) copolimerizado com poli(50,50-trimetilenocarbonato-co- $\epsilon$ -caprolactona) ou PDLLA/P(TMC-CL), além das características físico-mecânicas que o assemelham aos materiais utilizados para esse fim, apresentando elevada resistência ao impacto (Tams *et al.*, 1995).

Já na engenharia de tecidos, têm sido estudados *scaffolds* produzidos com poli(L-lactato-co- $\epsilon$ -caprolactona) em uma proporção 5:5, com tamanho de poro de 300 a 500  $\mu\text{m}$ . Estes *scaffolds* permitiriam movimentos de torção e flexão, por apresentarem elevada elasticidade, assim como uma recuperação de 97 % após sofrerem uma tração de até 500 %. Estes resultados mostram que este copolímero pode ser utilizado na regeneração de tecido cartilaginoso, pois permitem compressões e distensões sem perder sua estrutura, enquanto fornecem sinais mecânicos para manter as células aderidas durante a aplicação de tensão (Jung *et al.*, 2008).

Foram obtidos *scaffolds* de nanofibras de poli(L-ácido láctico) com poli( $\alpha$ ,  $\beta$ )-DL-ácido aspártico e colágeno (PLLA/PAA/Col I e III) produzidos por *electrospinning* com células-tronco adultas derivadas do estroma do tecido adiposo, a fim de produzir uma estrutura que mimetize uma matriz extracelular, para que as células hospedeiras utilizem o *scaffold* como substrato para a cultura e diferenciação, e estas possam: ressintetizar uma nova matriz natural e repovoá-la para a cicatrização de feridas e regeneração de pele. Analisaram-se a proliferação celular e sua morfologia para avaliar as interações entre as células e o *scaffold*, e a proliferação celular foi significativamente aumentada ( $p = 0,05$ ) em *scaffolds* de PLLA/PAA/Col I&III comparado com *scaffolds* de nanofibras de PLLA e PLLA/PAA (Ravichandran *et al.*, 2012).

Adamus e colaboradores (2012) produziram estruturas tubulares de alta porosidade feitas com poli(ácido láctico) (PLLA) e

poli(carbonato de trimetileno) (PTCMC) para serem usados como canais/tubos de suporte para guiar nervos durante a regeneração do sistema nervoso periférico após lesão traumática. As avaliações demonstraram que a blenda apresenta as características de tensão e elasticidade necessárias para a aplicação desejada, mesmo depois de ser esterilizada por radiação. Avaliaram-se *in vitro* suas propriedades de degradação hidrolítica do peso molecular, suas propriedades térmicas, morfológicas e mecânicas, concluindo que ocorre uma leve diminuição na massa do biomaterial após 12 meses de início da degradação hidrolítica, assim como uma diminuição nas propriedades físicas devido à hidrólise das ligações éster. Foi também feito um teste adicionando metilcelulose (MC) à blenda. Os resultados mostraram uma leve melhoria no desempenho dos canais do biomaterial, mas sem afetar os outros parâmetros físicos. Sendo assim, os autores concluíram que é possível passar a uma etapa de pesquisa a nível biológico e *in vivo* do material proposto, com ou sem metilcelulose.

Como o ácido láctico é o produto da degradação do PLA e influi na função metabólica das células, foi estudado o seu efeito em populações de células neurais, contendo células precursoras proliferativas neurais em cultura em monocamada. Pesquisas mostram que o ácido láctico elimina exogenamente radicais livres, produzidos na presença de peróxido de hidrogênio ou um fotoiniciador, o Irgacure 2959, comumente utilizado na preparação de biomateriais fotopolimerizáveis. Além de seus efeitos sobre os radicais livres, o ácido láctico reduziu o estado redox intracelular, aumentando a proliferação da população de células, e modificando a composição celular (Lampe *et al.*, 2009).

### **3.3.1 COMPÓSITOS DE PLLA COM CB**

Na atualidade, os compósitos são amplamente utilizados para as mais diversas aplicações, uma vez que as fibras naturais têm se tornado uma alternativa para o desenvolvimento de compósitos comerciais, pois oferecem vantagens como: a sustentabilidade, obtenção através de fontes naturais, baixa densidade, biodegradabilidade e baixo custo. O uso da celulose como reforço num compósito oferece, entre outras vantagens, a possibilidade de modificar quimicamente sua superfície devido à presença de grupos hidroxila e melhorar as propriedades mecânicas dos compósitos. Não obstante, uma das principais desvantagens do uso de fibras de celulose para produzir compósitos encontra-se no fato de que estas fibras produzem uma fraca interação na interface polímero-fibra, bem como uma dispersão das fibras pouco



homogênea na maioria das matrizes poliméricas, devido à natureza hidrofílica das fibras de celulose (Frone *et al.*, 2011).

Frone e colaboradores (2011) produziram compósitos de PLA com dois tipos de fibras de celulose: fibras de celulose microcristalina e fibras de madeira obtidas por hidrólise ácida e desintegração mecânica, respectivamente. A proporção de celulose adicionada foi de 2,5 % de fibras, fazendo-se necessário um tratamento de superfície para melhorar a compatibilidade entre os materiais. A incorporação foi feita pela técnica de fusão de mistura. Os materiais resultantes tiveram um módulo de elasticidade maior em estado vítreo, para ambos os tipos de fibras, porém foi maior para o caso de PLA com fibras obtidas por hidrólise ácida devido à elevada relação entre suas dimensões, o que melhora a transferência de estresse da matriz ao composto de preenchimento.

Enquanto o PLLA é um material popular para a produção de suportes para engenharia de tecidos, por ser biodegradável e biocompatível, suas propriedades superficiais não são adequadas ao crescimento celular devido à sua natureza hidrofóbica em comparação à matriz extracelular nativa, tornando-se desfavorável para a adesão e o crescimento celular. A hidrofiliabilidade é um dos fatores mais importantes que afetam a citocompatibilidade dos biomateriais. A adesão e o crescimento de células em uma superfície são fortemente influenciados pela relação hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, frequentemente denominada umectabilidade (Mikos *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2007).

Wang e colaboradores (2007) funcionalizaram a superfície de PLLA por hidrólise com NaOH e avaliaram a afinidade de fibroblastos L929 por célula de PLLA antes e depois da modificação da superfície. Foi constatando um aumento da hidrofiliabilidade e melhor rugosidade superficial do PLLA, o que melhora significativamente a adesão celular e o crescimento em PLLA modificado, podendo ser útil para aplicações em engenharia de tecidos.

Souza e colaboradores (2012), produziram biocompósitos de PLLA/CB utilizando PLLA comercial de elevada massa molecular e membranas de celulose bacteriana sintetizada pela bactéria *Gluconocetobacter hansenii*, ATCC 23769. Os biocompósitos foram caracterizados por calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA), difração de raios X (DRX), espectroscopia por infravermelho (FTIR), ângulo de contato e adesão celular. Observou-se que a membrana feita numa proporção 80/20 (PLLA/CB), preparada por *casting* com prévia secagem a vácuo da CB, apresentou melhor adesão, mostrou-se mais hidrofílica e não citotóxica.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais, equipamentos, reagentes e metodologias utilizadas para o desenvolvimento de cada uma das etapas deste projeto. Primeiramente será apresentada uma lista geral dos materiais, reagentes e equipamentos; posteriormente, serão descritas as metodologias utilizadas.

Materiais:

- Bateria de vidraria tanto para a produção do meio de cultura, quanto para a montagem do sistema de polimerização, (Diprolab, Brasil).
- Dessecador de vidro, (Diprolab, Brasil).
- Micropipeta 0,5 – 10  $\mu\text{L}$ , NPX-10, (NICHIRYO, Japão)
- Micropipeta 10 – 100  $\mu\text{L}$ , NPX-100, (NICHIRYO, Japão)
- Micropipeta 20 – 200  $\mu\text{L}$ , NPX-200, (NICHIRYO, Japão)
- Micropipeta 100 – 1000  $\mu\text{L}$ , NPX-1000, (NICHIRYO, Japão)
- Micropipeta 1000 – 5000  $\mu\text{L}$  NPX-5000 (NICHIRYO, Japão)
- Placas para cultura de células com superfície tratada, fundo chato de 6, 12, 24 e 96 poços, (TPP, Suíça).
- Tubos Falcon de 15 mL, (BD Bioscience, USA).
- Meio de cultura Manitol, produzido com: manitol Vetec (25 g  $\text{L}^{-1}$ ), extrato de levedura Himedia (5.0 g  $\text{L}^{-1}$ ) e peptona Himedia (3.0 g  $\text{L}^{-1}$ ) dissolvidos em água destilada.
- Inóculo de *Gluconacetobacter hansenii*, ATCC 23769.
- L-ácido láctico P.A., 85 %, Synth
- Álcool metílico P.A., 99,05 %, Vetec
- Clorofórmio P.A., 99,80 %, Nuclear
- Hidróxido de sódio (NaOH) P.A., Nuclear.
- Solução tampão fosfato (PBS), Sigma Aldrich.
- Nitrogênio gassoso comprimido ( $\text{N}_2$ ), (White Martins, Brasil).
- Peneira molecular 4Å aluminossilicato de sódio, (Sigma Aldrich)
- Fibroblastos L929
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), (Gibco)
- Soro fetal bovino 10 %, (Gibco)
- Solução de tripsina, (Gibco)
- Câmara de Neubauer (SP LABOR, Brasil)

- MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio] a uma concentração de  $1,90 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , (Promega)

Equipamentos:

- Agitador magnético com aquecimento, ACS-160, (SPLabor, Brasil)
- Bomba de vácuo, (DCM, Argentina)
- Balança semi-analítica, WLC 1/A2, (Radwag USA)
- Câmara de fluxo, (Valiclean, Brasil)
- Câmara de fluxo, (Veco, Brasil)
- Capela standar industrial, (AmazonLab, Brasil).
- Centrífuga Refrigerada, K241R, (Centurion Scientific, Inglaterra)
- Espectrofotômetro Elisa, Tp-Reader, (Thermo plate)
- Estufa UV  $\text{CO}_2$ , HF212UV, (Ultra Safe, Brasil)
- Estufa de laboratório (Nova Ética, Brasil).
- Freezer  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ , NU-9483GC, (Nuair, USA)
- Incubadora 430, (Nova Ética, Brasil)
- Liofilizador, L101, (Liotop, Brasil)
- Máquina de gelo em escamas, IMS40, (Icemaster, Espanha)
- Microscópio (MEDILUX, Espanha)
- pH metrômetro, model 68444, (HANNA, Spain)
- Incubadora orbital (shaker), TE-424, (Tecnal, Brasil)
- Microscópio eletrônico de varredura, JSM-6390LV, (JEOL, USA).
- Termobalança, SDT Q600 V20.9 Build 20 (TA instruments, USA).
- Differential Scanning Calorimeter DSC-50 detector (Shimadzu, Japão).
- Espectrofotômetro de infravermelho, Tensor 25, (Bruker, Alemanha)

#### 4.1 PREPARAÇÃO DE HIDROGÉIS DE CELULOSE BACTERIANA

Seguindo as metodologias descritas por Recouvreux (2008), Berti (2012) e Hu e colaboradores (2010), membranas e esferas de celulose bacteriana foram produzidas pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, linhagem ATCC 23769, cultivada em meio de cultura manitol com 10 % de pré-inóculo. No caso das membranas, a cultura foi feita em placas de 24 poços estéreis com 2 mL de meio de cultura, a 25 °C por 7 dias, sob condição estática.

Também foi possível obter um hidrogel de CB com formato de miliesferas, mediante cultura de *G. hansenii* em condições de agitação. Uma vez que numa cultura em agitação há forças que atuam sobre a superfície da esfera enquanto está sendo formada, estas afetam sua estrutura e tamanho. As condições de cultura foram escolhidas com base em resultados de trabalhos prévios realizados no Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab) e em resultados publicados na literatura nos últimos anos (Hu *et al.*, 2010). Desta forma as miliesferas foram produzidas em Erlenmeyers de 120 mL com 60 mL de meio de cultura, o qual foi inoculado e mantido sob agitação a 120 rpm e 30 °C e por 6 dias em incubadora com agitação (Shaker).

Em ambos os casos, a purificação da CB formada foi realizada com a remoção desta do meio de cultura e o tratamento com solução de NaOH 0,1 M a 50 °C por 24 h (Watanabe *et al.*, 1998; Pértile, 2007; Stumpf *et al.*, 2013) com o fim de remover as células de bactérias e outras impurezas presentes. Posteriormente, a CB foi lavada com água destilada até pH neutro e logo esterilizada em autoclave a 121 °C, 1,1 atm por 20 min. As membranas e esferas estéreis foram armazenadas em frascos de vidro a temperatura ambiente.

#### 4.2 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE POLIMERIZAÇÃO E PRODUÇÃO DOS BIOCÓMPÓSITOS

O processo de polimerização foi conduzido em três estágios: destilação/desidratação, oligomerização e polimerização *in situ* (policondensação). As condições mais adequadas de operação e temperatura foram selecionadas com base na literatura (Garlotta, 2001; Achmad *et al.*, 2009; Lasprilla, 2011; Siqueira, 2011; Choubisa *et al.*, 2013; Raquez *et al.*, 2013) e experimentos exploratórios conduzidos no InteLab.

### 4.2.1 Desidratação de L-ácido láctico

Para a polimerização, foi utilizado L-ácido láctico comercial de 85% de pureza (Synth), fazendo-se necessária a eliminação da água do reagente, uma vez que sua presença inibe a reação de policondensação. Utilizou-se um sistema de destilação a vácuo (75 mmHg), a 105 °C por uma hora. O sistema utilizado é mostrado na Figura 4.

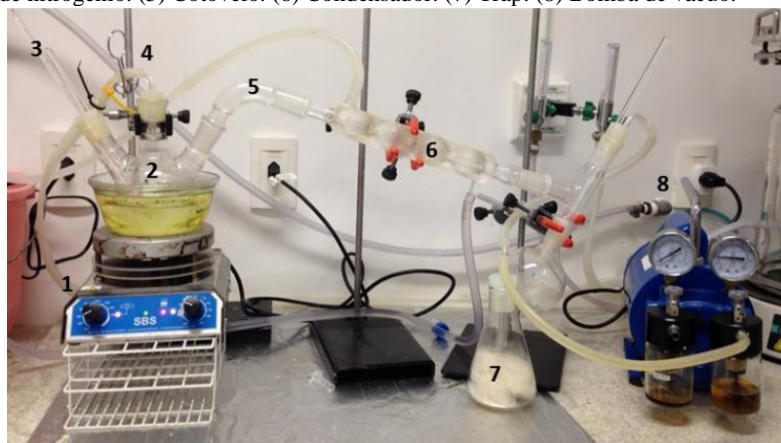
### 4.2.2 Oligomerização

No balão de três bocas, colocou-se 100 g de L-ácido láctico desidratado. O L-ácido láctico desidratado foi submetido à oligomerização a fim de converter o L-ácido láctico em oligômeros e em PLLA de baixa massa molar. Para isso, o sistema foi mantido em condições de vácuo a 150 °C por um período de três horas.

### 4.2.3 Polimerização *in situ*

Para a etapa de polimerização *in situ* na celulose bacteriana, seguiu-se um procedimento de polimerização por policondensação sem uso de catalisadores. A reação foi feita num balão de polimerização de três bocas conectado a uma entrada de nitrogênio, um condensador, uma bomba de vácuo e um termômetro, como se mostra na Figura 4.

Figura 4 - Sistema de Polimerização. 1) Placa de aquecimento com agitador magnético. (2) Balão de polimerização de três bocas. (3) Termômetro. (4) Entrada de nitrogênio. (5) Cotovelo. (6) Condensador. (7) Trap. (8) Bomba de vácuo.



À solução oligomerizada foram acrescentados 2,5 g de membranas e 2,5 g de milieúferas de CB estéreis e hidratadas. Em ambos os casos, foi retirado o excesso de água antes de serem adicionadas ao reator. Para

absorver a água gerada na reação de condensação, adicionou-se 1% (w/w) de peneira molecular com tamanho de poro nominal de 0,4 nm, (4Å aluminossilicato de sódio) gentilmente fornecida pela Professora Débora de Oliveira. A quantidade de peneira molecular adicionada foi calculada como fração do monômero desidratado (1%), de acordo procedimento reportado por Torres e colaboradores (2000). Antes de iniciar a polimerização, o sistema foi purgado passando um fluxo de nitrogênio por um minuto com o objetivo de remover a água do sistema.

Para determinar a temperatura de polimerização, verificou-se na literatura que existe uma ampla faixa de temperaturas que podem ser utilizadas para este processo dependendo do tipo de polimerização e do tipo de catalisador empregado. Assim, utilizaram-se como referência as metodologias descritas por Achmad e colaboradores (2009), Siqueira (2011), Lasprilla (2011) e Choubisa e colaboradores (2013), que estabelecem a produção de PLLA na faixa de 70 a 250 °C.

Achmad (2009) utilizou temperaturas de 150 até 250 °C para obter um polímero de elevada massa molar. Por sua vez, Siqueira (2011) utilizou uma temperatura de 70 °C para obter um polímero de baixa massa molar utilizando lipase B como catalisador. Tomando isto como referência e buscando trabalhar com condições de temperatura mais brandas, foram feitas polimerizações a temperaturas na faixa entre 75 e 150 °C, sendo 75, 90, 130 e 150 °C as temperaturas avaliadas.

Antes de iniciar a polimerização, o sistema foi purgado passando um fluxo de nitrogênio por um minuto com o objetivo de remover a água do sistema (Kaiharu *et al.*, 2007). Com base nos estudos exploratórios, o processo de polimerização foi conduzido a uma temperatura de 90 °C sob condições de vácuo (75 mmHg) para promover a remoção de água residual do sistema produzida na reação de condensação e deslocar o equilíbrio da reação no sentido de formação do polímero.

Após o processo de polimerização, as membranas e miliesferas de CB foram retiradas do reator e colocadas em álcool metílico em excesso para propiciar a precipitação do polímero formado, uma vez que este é insolúvel em água. Logo após, foram retiradas e submersas em água destilada para eliminar resíduos de ácido láctico, lactídeo e metanol presentes nas amostras. O processo foi conduzido sob agitação a 120 rpm a 25 °C por uma hora.

#### **4.2.4 Secagem das amostras**

Após a purificação, as membranas e miliesferas foram colocadas sobre papel filtro para retirar o excesso de água. As mesmas

foram divididas em duas partes: uma parte seca em estufa a 40 °C e a outra congelada a -80 °C para posterior liofilização.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOCOMPÓSITOS

Para a caracterização das amostras, foram levadas em consideração as metodologias descritas na literatura tanto para celulose bacteriana pura, PLLA puro, e os biocompósitos produzidos com estes biopolímeros (Quero *et al.*, 2009; De Souza, 2012; Stumpf *et al.*, 2013).

#### 4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com esta análise, o objetivo foi estudar a estrutura e morfologia dos biocompósitos. Seguiu-se a metodologia descrita por Berti (2012), na qual as amostras foram previamente congeladas a -80 °C por 24 h em um Freezer -80 °C, marca Nuaire, modelo NU-9483GC e, logo após, liofilizadas por 48 h num liofilizador Liotop, modelo L101 no Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab/UFSC). Após a liofilização, as amostras foram mantidas num dessecador de vidro.

A preparação das amostras e as análises de microscopia foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. As amostras liofilizadas foram fixadas sobre fitas de carbono aderidas a suportes de alumínio (*stubs*) e, posteriormente, metalizadas com ouro, para exame da superfície das miliesferas e membranas e a superfície de fratura (seção transversal) A microestrutura foi analisada no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV.

#### 4.3.2 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises térmicas foram feitas através de curvas de TGA obtidas em uma termobalança SDT Q600 V20.9 Build 20 no Laboratório de Materiais Vitrocerâmicos (Vitrocer) da UFSC. Para esta análise, foram utilizados aproximadamente 10,0 mg de cada amostra e aquecidas de 25 até 500 °C a uma taxa de 10 °C min<sup>-1</sup> sob atmosfera inerte de N<sub>2</sub> (De Souza, 2012; Souza *et al.*, 2013).

#### 4.3.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas em um detector Shimadzu DSC-50 na Central de Análises Químicas da UFSC. Sob um fluxo de nitrogênio (50 °C min<sup>-1</sup>), as amostras foram aquecidas de 25 a 200 °C numa taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> A temperatura máxima foi mantida por 2 min e, posteriormente, as amostras foram resfriadas até -90 °C, para serem aquecidas mais uma vez até 200 °C (Quero *et al.*, 2009; De Souza, 2012).



#### 4.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com refletância atenuada (ATR)

Como parte da caracterização dos biocompósito, foi feita uma análise estrutural das amostras buscando a identificação e determinação dos grupos funcionais, assim como a conformação da estrutura da macromolécula. Para este teste, utilizou-se um equipamento de infravermelho Bruker, Tensor 25, pertencente ao Laboratório de Materiais (LabMat) da UFSC. As amostras secas foram analisadas na região de 4000 a 450  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e acessório de refletância total atenuada (ATR), em condições ambiente (De Souza, 2012; Souza *et al.*, 2013).

#### 4.3.5 Estudo de degradação hidrolítica

Para avaliar o comportamento dos biocompósitos produzidos quando são submetidos à hidrólise em condições fisiológicas foi feito um estudo *in vitro* da degradação hidrolítica. Para isto, as massas secas iniciais dos compósitos com formato de esfera (miliesferas) foram pesadas em balança analítica e, posteriormente, foram submersas em tubos de ensaio com 10 mL de solução-tampão fosfato (pH = 7,4), sendo mantidas a 37 °C por 18 dias (Adamus *et al.*, 2012). As massas das amostras foram medidas a cada 6 dias, a partir da incubação.

A caracterização das amostras após o tempo de contato com a solução tampão foi feita por pesagem a fim de determinar a absorção hídrica e a perda de massa. Com este fim, cada amostra foi retirada do tubo de ensaio, removeu-se o excesso de solução tampão e pesou-se a massa do biocompósito juntamente com a massa de solução tampão absorvida para quantificar a absorção hídrica das amostras. Logo após as amostras foram liofilizadas e suas massas secas foram medidas. No final do ensaio, foram comparadas com as respectivas massas iniciais. O ensaio foi conduzido em triplicata usando miliesferas de CB pura como controle (Gong *et al.*, 2007).

Para o cálculo das percentagens de absorção hídrica e a perda de massa foram utilizadas as seguintes relações:

$$\text{Absorção Hídrica} = \frac{\text{massa úmida}_t}{\text{massa seca}_t} \quad (1)$$

$$\text{Perda de massa (\%)} = 100 \times \frac{(\text{massa seca}_0 - \text{massa seca}_t)}{\text{massa seca}_0} \quad (2)$$

Os dados obtidos foram analisados com um modelo de ajuste não linear, *one phase association*.

#### 4.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Como parte da caracterização dos biocompósitos, foi conduzido um ensaio de adesão celular buscando avaliar a interação entre células e o biomaterial produzido. Tomando como referência a norma ISO 10993-5:2009, a qual estabelece as diretrizes para realização dos ensaios de citotoxicidade *in vitro*, fibroblastos de tecido conectivo de camundongo, linhagem L929 foram semeados nos biocompósitos desenvolvidos. Os fibroblastos L929 são utilizados como referência em testes de citotoxicidade de biopolímeros devido a importância dos fibroblastos para os processos de reparação tecidual e remodelamento de tecidos. Além disso, são importantes na produção de componentes da matriz extracelular (Baxter *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 2006; Pértile, 2007).

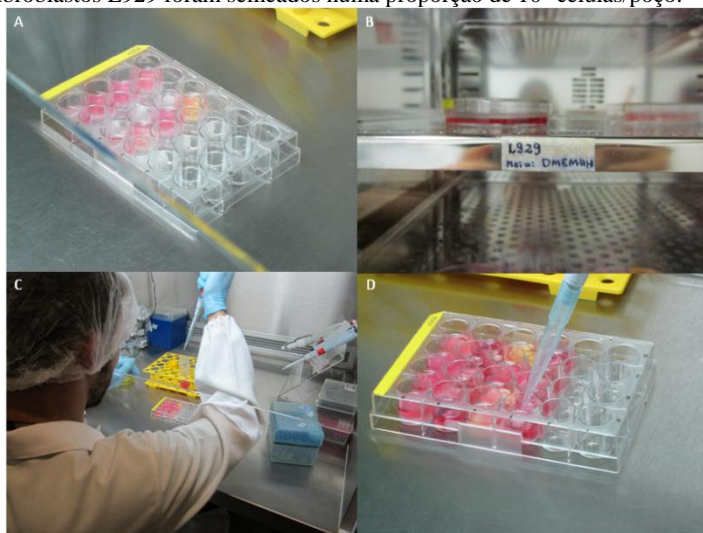
As amostras secas foram dispostas em placas de petri estéris e colocadas na câmara de fluxo (Veco, Brasil) para ser esterilizadas por radiação UV. Com ajuda de uma pinça se modificou a posição das amostras para expor toda a sua superfície à radiação, em intervalos de 30 minutos. O processo foi conduzido em condições ambiente no InteLab. O mesmo procedimento foi utilizado para os controles de CB pura. Para o ensaio de viabilidade celular, fibroblastos L929 foram cultivados em Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de penicilina/estreptomicina em atmosfera úmida com 5 % de CO<sub>2</sub>, a 37 °C. Os fibroblastos foram removidos da placa com solução de tripsina; a suspensão foi centrifugada, e então o meio foi removido e as células ressuspensas em meio de cultura para a realização da contagem em câmara de Neubauer (SP LABOR, Brasil).

As membranas de CB controle e os biocompósitos produzidos foram transferidos para uma placa de cultura de 24 poços (TPP, Suíça). Com a finalidade de que os controles e as amostras permanecessem no fundo dos poços da placa de cultura, foram utilizados cilindros de vidro estéreis para segurá-las (os cilindros possuíam um diâmetro exterior ajustado ao diâmetro interno dos poços). Estes cilindros de vidro permaneceram na placa até o final de cada experimento. Foi feita a semeadura das células em uma proporção de 10<sup>5</sup> células/poço. No caso das membranas controle, a semeadura foi feita na superfície superior de cada membrana (rede de fibras mais densa), e mantidas em câmara com 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C (Figura 5).

A análise da viabilidade celular foi realizada em triplicata, pelo método colorimétrico MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazólio] a uma concentração de 1,90 mg·mL<sup>-1</sup>. Foram analisados três pontos a cada 24 h. Para a

realização do teste de MTS, o meio de cultura dos poços foi removido, os controles e as amostras foram lavados com 500  $\mu\text{L}$  de meio novo, sendo transferidas para uma nova placa de cultura. Então, foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de meio novo e 60  $\mu\text{L}$  da solução de MTS em cada poço. As amostras foram incubadas por uma hora; após este período homogeneizou-se o meio de cada amostra, e 100  $\mu\text{L}$  de solução foram transferidos para uma placa de 96 poços. A absorbância foi lida em leitor de microplacas (Thermo placa TP leitor NM, China) a 490 nm. (Da Silva, 2012).

Figura 5 - Ensaio de viabilidade celular. A) Controle e amostras foram submersos em meio de cultura 24 horas antes do teste. B) Fibroblastos de camundongo, linhagem L929 foram mantidos em atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$ , a 37 °C. (C e D) Fibroblastos L929 foram semeados numa proporção de  $10^5$  células/poço.





## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a produção dos biocompósitos foi necessário primeiramente produzir os hidrogéis de celulose bacteriana. Os hidrogéis preparados, acrescidos de L-ácido láctico, foram utilizados para conduzir uma série de reações de polimerização a fim de determinar uma temperatura adequada para a polimerização *in situ*. Posteriormente, foram produzidos e caracterizados os biocompósitos. Os resultados obtidos serão apresentados seguindo esta sequência.

### 5.1 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE POLIMERIZAÇÃO

#### 5.1.1 Produção da celulose bacteriana

Hidrogéis de celulose bacteriana com formato de membranas e de miliesferas foram produzidos por cultivo de *Gluconacetobacter hansenii*, ATCC 23769. Como foi descrito no capítulo de Materiais e Métodos, dependendo do formato desejado para os hidrogéis, foram utilizados métodos de cultura diferentes. Como pode ser observado na Figura 6, macroscopicamente tanto as membranas quanto as miliesferas produzidas para formar os biocompósitos apresentaram características intrínsecas da celulose bacteriana, ou seja, aparência gelificante, flexibilidade e cor branca semitransparente, quando no estado hidratado.

Para este trabalho foram produzidas membranas de CB com um diâmetro equivalente ao diâmetro interno dos poços da placa de cultura de 24 poços (1,54 cm). Foi possível detectar que a superfície superior da membrana é mais esbranquiçada do que a superfície inferior, como já reportado por Berti (2012). Isso se deve às membranas de CB apresentarem duas superfícies distintas, uma de alta densidade de nanofibras e outra de baixa densidade, sendo mais densa a área em contato direto com o oxigênio do ar.

As esferas produzidas apresentaram diâmetro médio de  $0,528 \pm 0,105$  cm, com uma estrutura mais densa no exterior comparado ao centro (Figura 7).

Figura 6 - Produção de hidrogéis de celulose bacteriana. A) Inóculo de *Gluconoacetobacter hansenii*, B) Membranas de celulose bacteriana hidratadas, C) Esferas de celulose bacteriana hidratadas.

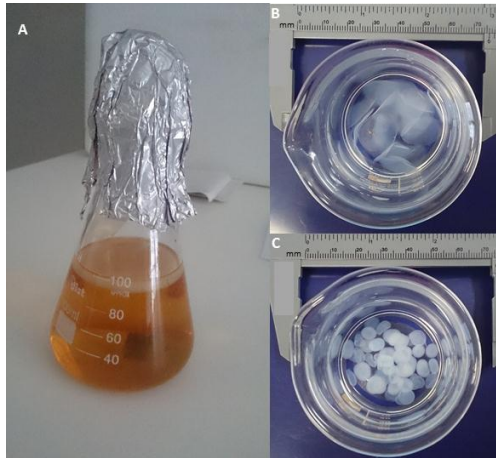
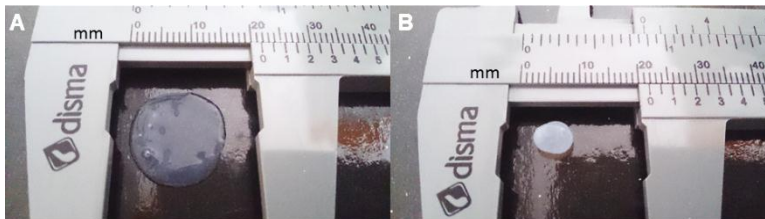


Figura 7 - Hidrogéis de celulose bacteriana utilizados na polimerização in situ. A) Membranas de CB com diâmetro de 1,54 cm, equivalente ao diâmetro interno dos poços da placa de 24 poços. B) Esferas de CB com diâmetro médio de  $0,528 \pm 0,105$  cm.



### 5.1.2 Determinação da temperatura de polimerização

Para determinar a temperatura em que seriam produzidos os biocompósitos, foram feitas polimerizações preliminares a temperaturas de 75, 90, 130 e 150 °C. No caso das polimerizações conduzidas a temperaturas de 130 e 150 °C observou-se que as membranas e esferas começaram a degradar antes das 24 h de polimerização. Possivelmente, ocorreu uma hidrólise ácida da celulose motivada pela alta temperatura, agitação e a presença em excesso do ácido láctico no meio de reação. A hidrólise ácida é normalmente utilizada para isolar nanocristais de celulose das fibras de celulose de origem vegetal e bacteriana. Neste

processo, tem que ser considerada a concentração do ácido, a relação celulose/ácido, a temperatura e o tempo de hidrólise. Geralmente, a hidrólise ocorre na presença de ácidos fortes, ácido sulfúrico e/ou clorídrico, os quais fazem com que as regiões não cristalinas ou nos domínios amorfos da celulose sejam hidrolisadas (Araki *et al.*, 1998; Martínez-Sanz *et al.*, 2011). Neste caso, nas condições descritas previamente, as fibras da CB ficaram dissolvidas no meio, impossibilitando a coleta das amostras e a purificação do polímero produzido.

Tentativas para purificar o PLLA produzido fracassaram, uma vez que, para isto, o polímero tem que ser dissolvido em clorofórmio, seguido de precipitação em excesso de metanol e posteriormente filtrado. Esta sequência de etapas deve ser repetida três vezes, seguida de secagem do polímero por 24 h (Kaihara *et al.*, 2007). No entanto, as nanofibras dissolvidas entupiram os filtros, impossibilitando o processo de purificação. Pela impossibilidade de purificação por filtração, estas temperaturas foram então desconsideradas. Por sua vez, com a temperatura de 75 °C, as amostras polimerizadas por 24 e 48 h ainda pareciam ter ácido lático dissolvido no interior, o que pode ser observado na Figura 8. Como consequência, foi necessário mantê-las submersas em água destilada, em condições de agitação por vários dias, para poder eliminar o ácido lático retido e, posteriormente, secar ou liofilizar as amostras. Com a temperatura de 90 °C foi possível produzir os biocompósitos sem a desintegração da rede de fibras da CB e sem que as amostras apresentassem aparência de ter ácido lático retido em seu interior.

Figura 8 - Amostras de compósitos obtidos após 24 h de polimerização a 75 °C.



Pelos resultados descritos anteriormente, as temperaturas de 75 °C, 130 °C e 150 °C foram descartadas e optou-se por utilizar a temperatura de 90 °C para a produção dos biocompósitos. Desta forma, as polimerizações subsequentes foram conduzidas a 90 °C, em condições de vácuo (75 mmHg) com a finalidade de promover a remoção da água produzida na reação de condensação do sistema e, deslocar o equilíbrio da reação no sentido de formação do polímero. No Quadro 2 são apresentados os resultados obtidos com as temperaturas testadas.

Quadro 2 – Resultados obtidos para varredura de temperatura de polimerização.

| Temperatura | Observações  | Resultado    |
|-------------|--|--------------|
| 75 °C       | Presença de ácido láctico em todas as amostras         | Desfavorável |
| 90 °C       | Produção do biocompósito                               | Favorável    |
| 130 °C      | Desintegração das fibras de CB durante a polimerização | Desfavorável |
| 150 °C      | Desintegração das fibras de CB durante a polimerização | Desfavorável |

## 5.2 PRODUÇÃO DOS BIOCOMPÓSITOS

Como foi descrito previamente, o processo de polimerização foi conduzido em três estágios: destilação/desidratação, oligomerização e polimerização *in situ*, pelo que os resultados serão apresentados nessa ordem.

### 5.2.1 Desidratação e oligomerização do L-ácido láctico

No caso da desidratação do ácido láctico, o processo foi conduzido de acordo com as condições descritas na metodologia. Em resumo, após 1,5 h de oligomerização, foi possível observar a formação de cristais, tanto na boca do reator ligada ao cotovelo, quanto no próprio cotovelo. A formação desses cristais ocorreu porque durante essa etapa do processo, tanto o monômero (L-ácido láctico) quanto os oligômeros, o lactídeo e a água vaporizaram, formando um condensado no cotovelo ligado ao sistema de resfriamento (Figura 4). Esta situação coincide com o reportado por Achmad e colaboradores (2009), os quais também observaram a formação de cristais durante o processo de oligomerização. Ao término desta etapa, o sistema foi aberto para retirar esses cristais e continuar o processo de polimerização.

A fim de comprovar a formação do lactídeo foi feita uma tentativa de purificar os cristais formados utilizando a metodologia



descrita por Jahno (2005). De acordo com esta metodologia, o lactídeo é dissolvido em acetona numa proporção de 2 g de lactídeo para 3 g de acetona, a mistura foi mantida sob agitação à 25 °C por uma hora. Logo após, a foi mantida na geladeira (5 °C), por 5 dias para posteriormente separar o lactide do solvente sob condições de vácuo (5 mmHg) e temperatura elevada 100 °C. Porém, a quantidade de cristais formada foi tão escassa que não foi possível recuperar o lactídeo para fazer as análises correspondentes. Todavia, foi possível observar que se tratava de um composto de elevada higroscopicidade, pois ao ser retirado do sistema começou a absorver elevadas quantidades de água, o que coincide com uma das características do lactídeo (Groot *et al.*, 2010).

### 5.2.2 Polimerização *in situ*

Para a etapa de polimerização *in situ* nos hidrogéis de celulose bacteriana, foram adicionados na solução monomérica com o intuito de propiciar a policondensação dentro dos poros da celulose bacteriana.

Desta forma, após 24 e 48 h de polimerização, nas condições descritas, foram obtidos biocompósitos de PLLA e CB por um processo de policondensação *in situ*, sem o uso de catalisadores.

Macroscopicamente foi possível identificar uma modificação nas miliesferas e nas membranas de CB adicionadas ao reator. Como pode ser visualizado na Figura 9, há diferença nas características das amostras obtidas em comparação com os hidrogéis puros apresentados na Figura 7.

Figura 9 - Amostras hidratadas dos biocompósitos de PLLA e CB com formato de esfera, produzidos após 48 h de polimerização.



Fisicamente, tanto as membranas quanto as miliesferas eram mais rígidas. Diferentemente do hidrogel de CB, que pode ser facilmente comprimido ao se exercer um pouco de pressão, nos biocompósitos não foi possível realizar essa compressão, o que era facilmente percebido no momento de coletar as amostras com a pinça. Também a textura foi modificada, passando de lisa e sem aderência para uma textura pegajosa. Outro atributo dos hidrogéis de CB que sofreu modificação visível foi a cor, sendo que ao invés de apresentar-se semitransparentes quando hidratadas, as membranas e miliesferas exibiram uma cor branca fosca.

Para facilitar à identificação dos resultados de cada uma das amostras, a partir desta seção as amostras serão codificadas de acordo a Tabela 1.

Tabela 1 - Codificação das amostras dos biocompósitos produzidos.

| Amostra                                    | Código |
|--|--------|
| Celulose bacteriana pura                   | CB-p   |
| Esferas biocompósitas polimerizadas 24 h   | EB1    |
| Esferas biocompósitas polimerizadas 48 h   | EB2    |
| Membranas biocompósitas polimerizadas 24 h | MB1    |
| Membranas biocompósitas polimerizadas 48 h | MB2    |

As massas secas dos controles são apresentadas na Tabela 2. Por sua vez, as massas secas das amostras e a percentagem média de fibras de CB presente nos biocompósitos, são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 2 - Massas secas dos hidrogéis de celulose bacteriana com formatos de esfera e de membrana.

| Celulose Bacteriana | Massa seca (mg) |
|---------------------|-----------------|
| Miliesferas         | $1,0 \pm 0,1$   |
| Membranas           | $0,8 \pm 0,1$   |

Tabela 3 - Proporção de fibras presentes nos biocompósitos de PLLA/CB.

| Amostra | Massa seca (mg)  | Celulose Bacteriana (%) |
|---------|------------------|-------------------------|
| MC1     | $53,8 \pm 2,7$   | $1,5 \pm 0,2$           |
| MB2     | $112,2 \pm 15,0$ | $0,7 \pm 0,1$           |
| EB1     | $64,3 \pm 5,5$   | $1,5 \pm 0,1$           |
| EB2     | $108,1 \pm 14,2$ | $0,9 \pm 0,1$           |

Os dados de percentagem mostrados na Tabela 3 foram obtidos da seguinte maneira:

$$\%CB \text{ no biocompósito} = \frac{\text{massa CB}}{\text{massa Biocompósito}} \times 100$$

MC1

$$\%CB = \frac{0,8}{53,8} \times 100 = 1.5 \%$$

MC2

$$\%CB = \frac{0,8}{112,2} \times 100 = 0.7 \%$$

EB1

$$\%CB = \frac{1,0}{64,3} \times 100 = 1.5 \%$$

EB2

$$\%CB = \frac{1,0}{108,1} \times 100 = 0.9 \%$$

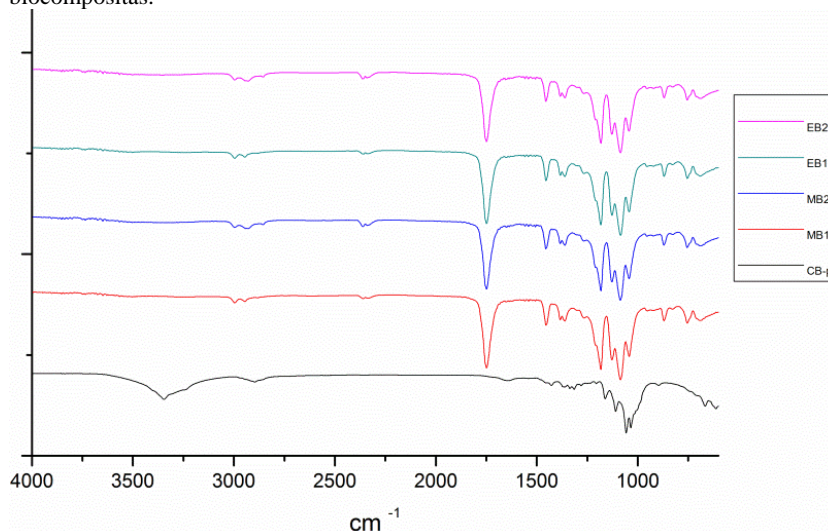
Como esperado, observa-se que a proporção de fibras presentes no biocompósito diminui ao longo do tempo, pois quanto maior o tempo de polimerização, maior a formação de PLLA.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOCOMPÓSITOS

#### 5.3.1 Interações Físico-Químicas nos Biocompósitos de PLLA-CB analisados por FTIR-ATR

Análises de espectroscopia no infravermelho foram feitas para as amostras dos biocompósitos produzidos com 24 e 48 horas de polimerização, assim como para o controle de CB pura. Os espectros obtidos são apresentados na Figura 10.

Figura 10 - Espectros de Infravermelho com ATR obtidos para amostras biocompósitas.



As atribuições das bandas do espectro de CB pura obtido neste trabalho são apresentadas na Tabela 4, de acordo as identificações reportadas por Gea e colaboradores (2010).

Em seus respectivos trabalhos, Garlotta e colaboradores (2001) e Gupta e colaboradores (2007) fizeram uma compilação dos dados obtidos em diversas análises de FTIR para identificar as bandas características do PLLA puro. Usando estes dados como referência e os resultados obtidos por Motta e colaboradores (2006) para PLLA cristalino (Ver Apêndice A), os espectros das amostras biocompósitas foram analisados. As atribuições das bandas do espectro dos biocompósitos obtidos neste trabalho são apresentadas na Tabela 5.

Avaliando o espectro dos biocompósitos EB1, EB2, MB1 e MB2, foi observado que as principais bandas de absorção detectadas correspondiam ao estiramento do grupo funcional C=O e ao estiramento do grupo C-O. Comparando os resultados obtidos de todas as amostras com os dados reportados na literatura para o PLLA puro, observou-se que em todos os casos os biocompósitos apresentam um espectro de absorção semelhante ao do PLLA em sua forma pura.

Tabela 4 - Atribuição dos picos de absorção de FTIR para controle de CB.

| Banda de absorção (cm <sup>-1</sup> ) | Atribuição  |
|---------------------------------------|---|
| 3346                                  | O-H, estiramento                                  |
| 3244                                  | O-H, estiramento                                  |
| 2895                                  | CH <sub>2</sub> , estiramento assimétrico         |
| 1647                                  | Água absorvida                                    |
| 1635                                  | C(O-H (da água absorvida)                         |
| 1427                                  | (HCH,OCH), torção                                 |
| 1362                                  | CH <sub>3</sub> , deformação                      |
| 1161                                  | (C-O-C), estiramento assimétrico                  |
| 1109                                  | (C-C), estiramento<br>(polissacarídeos, celulose) |
| 1057                                  | (C-O), estiramento                                |
| 1034                                  | (C-O), torção                                     |

Tabela 5 - Atribuição dos picos de absorção de FTIR para as amostras compósitas de PLLA-CB produzidas por policondensação.

| Banda de absorção (cm <sup>-1</sup> ) |          | Atribuição                       |
|---------------------------------------|----------|----------------------------------|
| 24 horas                              | 48 horas |                                  |
| 2993                                  | 2995     | CH, estiramento assimétrico      |
| 2945                                  | 2928     | CH, estiramento simétrico        |
| -                                     | 2855     | CH                               |
| 1747                                  | 1749     | -C=O, estiramento carbonila      |
| 1454                                  | 1456     | CH <sub>2</sub> , torção angular |
| 1383                                  | 1383     | CH, deformação simétrica         |
| 1361                                  | 1361     | CH, deformação assimétrica       |
| 1182                                  | 1182     | (-C-O-), estiramento             |
| 1128                                  | 1128     |                                  |
| 1086                                  | 1086     |                                  |
| 1043                                  | 1043     | O-H, torção                      |
| 870                                   | 869      | (-C-C-), estiramento             |

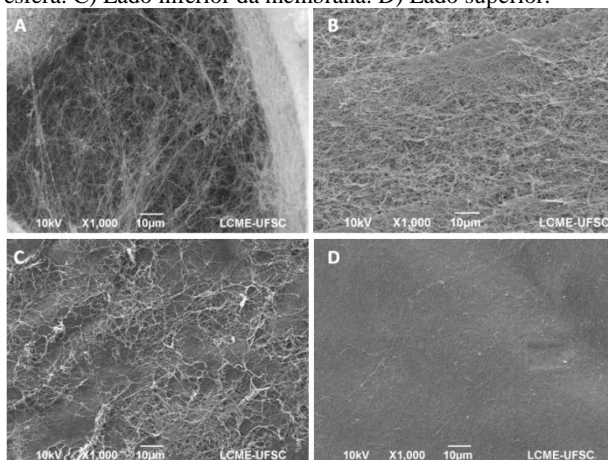
Uma vez que a análise no infravermelho é feita na superfície do biocompósito e visto que as imagens de MEV sugerem que as fibras de CB ficaram presas dentro da matriz do PLLA formado, é possível que os biocompósitos de PLLA e CB produzidos tenham apresentado um comportamento de espectro de absorção mais parecido com o do PLLA. Esta observação corrobora os resultados encontrados por De Souza (2012) em biocompósitos de PLLA/CB.

Essa é mais uma evidência da formação de poli(L-ácido láctico) e, em consequência, a produção de biocompósitos de poli(L-ácido láctico) e celulose bacteriana mediante o processo de polimerização sugerido neste trabalho. Porém não foram detectados picos de absorção ou deslocamentos significativos que possam sugerir uma interação química entre a CB e o PLLA produzido.

### 5.3.2 Distribuição das fibras de celulose bacteriana no biocompósito

Na Figura 11 são apresentadas as micrografias dos controles de CB com formato de esfera e membrana. Observa-se que as miliesferas de CB apresentam uma microestrutura externa diferente da microestrutura interna, sendo que no interior, a densidade das fibras é maior comparada com o exterior, o que corrobora que as membranas possuem uma superfície formada por um arranjo altamente denso de nanofibras de CB (lado denso) e a outra superfície com um arranjo anisotrópico e poroso de nanofibras de CB (lado poroso) como já relatado por Bäckdahl e colaboradores (2006) e Berti (2012).

Figura 11 - Micrografias de miliesferas e membranas de celulose bacteriana puras liofilizadas com ampliação de 1000×: A) Superfície externa da esfera. B) Superfície interna da esfera. C) Lado inferior da membrana. D) Lado superior.



Amostras dos biocompósitos produzidos foram também analisados por esta técnica. Obtiveram-se micrografias dos compósitos com formato de membranas e miliesferas polimerizadas por 24 e 48 h. A partir das imagens geradas, é possível observar que a microestrutura da CB foi modificada e um novo material foi produzido. Esta situação se detectou para todos os biocompósitos, tanto com formato de membrana quanto de esfera nos dois tempos de polimerização.

Em todos os casos, ao observar as imagens visualiza-se que os poros formados pela rede de nanofibras que conformam os hidrogéis de CB (Figura 11) foram preenchidos com um material que aparenta ter uma massa regular e lisa, provavelmente devido ao PLLA puro. As micrografias obtidas dos biocompósitos de 24 h de polimerização são mostradas na Figura 12 (membranas) e na Figura 13 (esferas).

Nas membranas biocompósitas as superfícies de cada um dos seus lados apresentaram-se diferentes, preservando as assimetrias observadas nas membranas-controle (CB pura). No caso das miliesferas, observa-se que o centro foi preenchido pela massa de polímero produzida e que essa massa vai se estendendo desde o centro para a superfície exterior, sendo esta mais porosa.

Figura 12 - Micrografias das duas superfícies dos biocompósitos com formato de membrana produzidos após 24 horas de polimerização. As imagens A, B e C correspondem à mesma superfície com ampliações de 1000 $\times$ , 5000 $\times$  e 10000 $\times$ , respectivamente. Por sua vez as imagens (D), (E) e (F) correspondem à superfície oposta nas mesmas ampliações. Pode-se visualizar que a superfície é mais densa num dos lados e que em ambos os casos as fibras de celulose ficaram bem distribuídas no biocompósito.

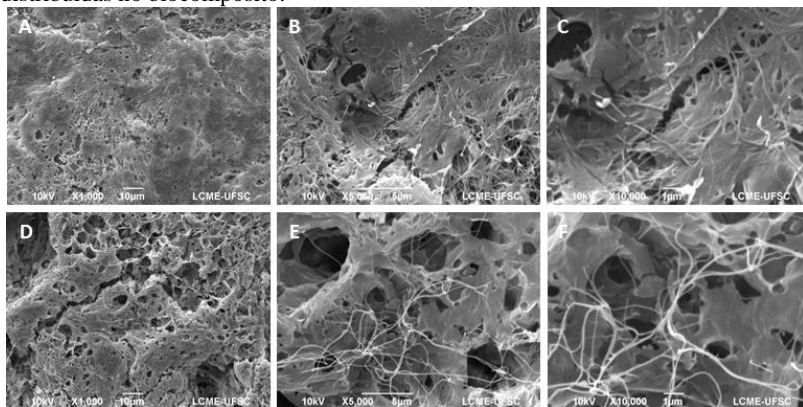
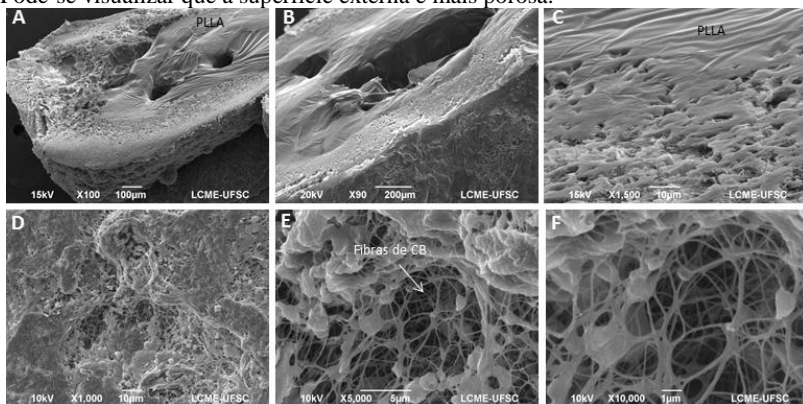


Figura 13 - Micrografias dos biocompósitos com formato de esfera produzidos após 24 horas de polimerização. As imagens A, B e C correspondem ao corte transversal da amostra com diferentes ampliações. Por sua vez, as imagens (D), (E) e (F) correspondem à superfície externa dos biocompósitos em diferentes ampliações. Pode-se visualizar que a superfície externa é mais porosa.



Nas ampliações de 10000 $\times$ , é facilmente identificada a presença das nanofibras de celulose. Nas imagens, verifica-se que estas estão presas dentro da matriz de PLLA formada. Verifica-se também uma boa

dispersão, já que as amostras parecem ter conservado sua distribuição original sem alterações em sua morfologia. A mesma estrutura fibrosa, observada na CB pura (Lee *et al.*, 2009) é mantida no biocompósito. Cabe destacar que não se observaram aglomerações das fibras de celulose. Este é um ponto positivo uma vez que como descrito por Raquez e colaboradores (2013), a hidrofobicidade das nanofibras de celulose, tanto as de origem vegetal quanto bacteriana, dificulta a produção de biocompósitos com fibras de celulose em uma matriz hidrofóbica como o PLLA, principalmente pela dificuldade de se conseguir uma boa dispersão das fibras na matriz.

### 5.3.3 Estabilidade térmica dos biocompósitos de PLLA-CB

A Figura 14 mostra as curvas termogravimétricas (curvas TG e DTG) obtidas para os biocompósitos MB1 e MB2. A avaliação do perfil das curvas termogravimétricas derivadas indica um comportamento de decomposição em três etapas. Este perfil não parece evidente nas curvas termogravimétricas nas quais a decomposição dos biocompósitos parece acontecer em um único estágio, porém ao analisar as curvas derivadas (DTG) as inflexões nas curvas termogravimétricas ficaram evidentes, aparecendo três eventos térmicos em cada curva, como pode ser observado na Figura 14b.

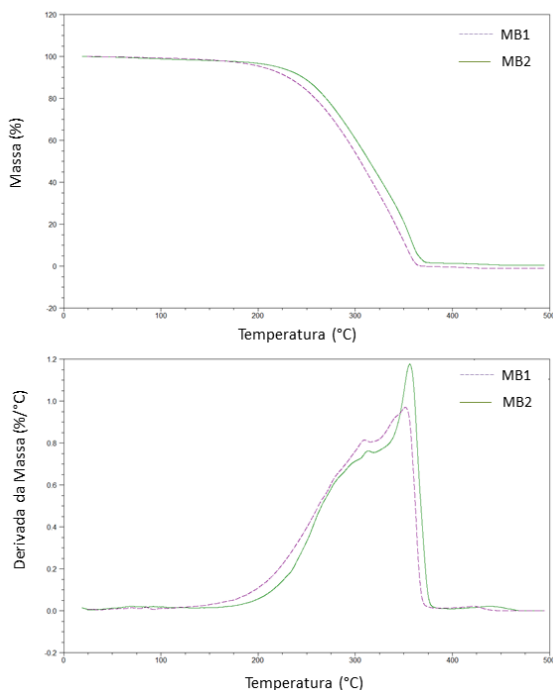
O primeiro evento está relacionado à perda de água superficial das amostras, permitindo a observação de um evento térmico na faixa de 60 aos 70 °C e uma perda de massa de aproximadamente 1,6 %. Possivelmente, este evento foi ocasionado pelas fibras de CB presentes nos biocompósitos, uma vez que como foi observado por De Souza (2012), a CB pura apresenta eventos endotérmicos a 70 °C, causados pela evaporação da água superficial, e apresenta uma perda de massa de 4,5 a 7,5 %.

Na faixa dos 300 a 360 °C observaram-se os outros dois eventos térmicos. As curvas derivadas evidenciaram inflexões em 309,60 °C e 351,27 °C para os biocompósitos com formato de membrana produzidos após 24 h de policondensação (MB1), e 313,66 °C e 356,26 °C, no caso dos biocompósitos produzidos após 48 horas de policondensação (MB2). Um comportamento semelhante foi observado para os biocompósito com formato de esfera. O primeiro pico pode ser atribuído à CB, uma vez que as curvas de DTG para CB-p reportadas na literatura evidenciam uma temperatura de degradação máxima na faixa dos 300 aos 350 °C. Por sua vez, o terceiro evento corresponde à temperatura máxima de degradação do PLLA, como foi observada por Murariu e



colaboradores (2010), tendo em vista que esta temperatura está na faixa de 330 a 390 °C.

Figura 14 - Curvas TG/DTG dos biocompósitos MB1 e MB2. A) Curva DTG para os bicompositos com MB1 e MB2. B) Curva TG para os bicompositos com MB1 e MB2.



A altura do pico da curva DTG pode ser usada para propósitos quantitativos, uma vez que a derivada da massa com respeito ao tempo é zero quando não há perda de massa e que quando há variação de massa a derivada é diferente de zero, isto é, o pico DTG pode ser considerado proporcional à perda de massa da amostra. Desta forma, e como foi feito por Siqueira (2011), a temperatura de degradação que foi considerada para os biocompósitos é a equivalente ao maior pico na curva DTG, ou seja, 351,27 °C para as amostras com formato de membrana que foram polimerizadas por 24 h (MB1), 356,26 °C para as amostras polimerizadas por 48 horas (MB2), 353,72 °C para as amostras com formato de esfera polimerizadas por 24 h (EB1) e, 357,63 °C para as amostras polimerizadas por 48 horas (EB2), como aparece na Tabela 6.

Tabela 6 - Temperaturas de degradação térmicas obtidas por TGA.

| Amostra | T <sub>onset1</sub><br>(°C) | T <sub>max 1</sub><br>(°C) | Perda<br>de<br>massa <sub>1</sub><br>(%) | T <sub>onset 2</sub><br>(°C) | T <sub>max 2</sub><br>(°C) | T <sub>onset 3</sub><br>(°C) | T <sub>max 3</sub><br>(°C) | Perda<br>de<br>massa <sub>2</sub><br>(%) |
|---------|-----------------------------|----------------------------|--|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|--|
| MB1     | 70,43                       | 84,39                      | 1,30                                     | 252,60                       | 309,60                     | 315,57                       | 351,27                     | 98,26                                    |
| MB2     | 69,81                       | 92,03                      | 1,95                                     | 251,18                       | 313,66                     | 317,81                       | 356,26                     | 96,39                                    |
| EB1     | 67,30                       | 83,94                      | 1,21                                     | 245,65                       | 310,59                     | 316,20                       | 353,72                     | 96,89                                    |
| EB2     | 69,77                       | 93,01                      | 1,98                                     | 248,80                       | 315,13                     | 318,78                       | 357,63                     | 96,45                                    |

Em seu trabalho de 2011, Siqueira relacionou os valores da temperatura de degradação obtidos com os valores de massa de PDLLA produzido em diferentes condições de temperatura. Concluiu que houve um incremento da temperatura de degradação do polímero com o aumento da massa molar dos polímeros produzidos, ou seja, observou uma temperatura de degradação de 324,1°C para PDLLA de 3000 g mol<sup>-1</sup>, 365,8 °C para MW de 8000 g·mol<sup>-1</sup> e 366,1 °C para Mw 8500 g mol<sup>-1</sup>. De acordo com essas observações, e comparando os valores obtidos, para a temperatura de decomposição máxima em ambos os tempos de polimerização, sugere-se que o PLLA produzido por policondensação limitou-se a um peso molar inferior a 3000 g mol<sup>-1</sup>.

A massa é estável no intervalo entre 98,5 e 150 °C para os biocompósitos tanto de 24 como de 48 h de polimerização. Pode-se assumir que este é um intervalo de temperatura adequado para o processamento dos biocompósitos produzidos. A existência de dois picos de decomposição térmica definidos não só evidencia a formação do PLLA no biocompósito, mas também a falta de interação química entre os componentes do biomaterial.

### 5.3.4 Comportamento térmico dos biocompósitos

Uma análise de calorimetria exploratória foi feita para determinar o comportamento térmico dos biocompósitos produzidos. Na Figura 15 e Figura 16 podem ser observadas as curvas de DSC para o primeiro e segundo aquecimento das amostras. Observando as curvas, percebe-se que os biocompósitos apresentaram um comportamento de um material predominantemente amorfo, uma vez que não é possível visualizar as temperaturas de transição vítrea e de fusão.

Quando há um alto grau de cristalinidade do polímero, pode ser observado um pico endotérmico de fusão no termograma do primeiro aquecimento Peres, (2012). Como não há um pico de cristalização evidente, o material obtido é predominantemente amorfo Siqueira (2011). Segundo Auras (2004), se os polímeros de ácido láctico estão

constituídos por mais de 93 % de L-ácido láctico estes são semicristalinos; já quando está constituído por este ácido em percentagens menores, na faixa de 50 a 93 %, o polímero resultante é amorfo. Assim, como esperado, a presença das fibras de celulose bacteriana leva à formação de um material predominantemente amorfo. Este comportamento coincide com o observado nos biocompósitos de PLLA e CB produzidos por Quero e colaboradores (2009).

Os resultados de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e temperatura de fusão ( $T_m$ ) são apresentados na Tabela 7. No caso dos biocompósitos produzidos, não foi observado um pico referente à temperatura de cristalização ( $T_c$ ). Também pode ser observado que as temperaturas  $T_g$  e  $T_m$  são consideravelmente diminuídas em comparação com as  $T_g$  ( $\approx 58$  °C) e  $T_m$  ( $\approx 180$  °C) do PLLA puro. No caso das amostras com 24 h de polimerização não foi possível identificar um pico de  $T_m$ . Isto significa que os biocompósitos com este tempo de polimerização são mais amorfos em comparação com os de 48 h (Malmgren *et al.*, 2006). Cabe lembrar que a  $T_g$  é dependente da massa molar e da pureza óptica do material, e a  $T_m$  é também dependente da pureza óptica, portanto é de se esperar uma diminuição dessas temperaturas características, causada pela presença das fibras de CB (Lim *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos sugerem que as fibras de CB na matriz de PLLA causaram um efeito similar ao ocasionado por plastificantes como o PEG no PLLA, ocasionando um espaçamento das cadeias do polímero aumentando assim o volume livre e diminuindo em consequência a  $T_g$  (Hassouna *et al.*, 2011). No caso da  $T_m$ , Lim e colaboradores (2010) reportaram uma diminuição da pureza óptica pode ocasionar uma diminuição de até 50 °C na temperatura de fusão. A diminuição das temperaturas  $T_g$  e  $T_m$  amplia a janela de aplicações dos biocompósitos de PLLA.

Tabela 7 - Temperaturas de transição vítrea e fusão dos biocompósitos PLLA/CB.

|          | $T_g$<br>(°C) | $T_m$<br>(°C) | $\Delta H_m$<br>(J·g <sup>-1</sup> ) | $\chi$<br>(%) |
|----------|---------------|---------------|--------------------------------------|---------------|
| 24 horas | 12,76         | -             | -                                    | -             |
| 48 horas | 17,97         | 83,19         | 7,12                                 | 7,79          |
| 24 horas | 13,37         | -             | -                                    | -             |
| 48 horas | 18,70         | 89,93         | 7,41                                 | 7,96          |

Figura 15 - Curvas de DSC do 1º aquecimento dos biocompósitos MB1 e MB2.

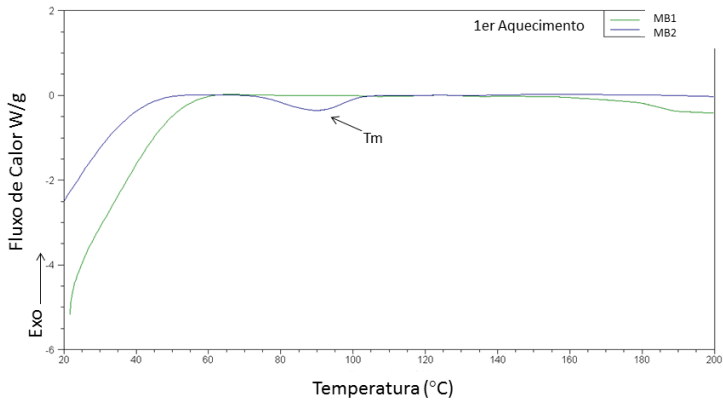
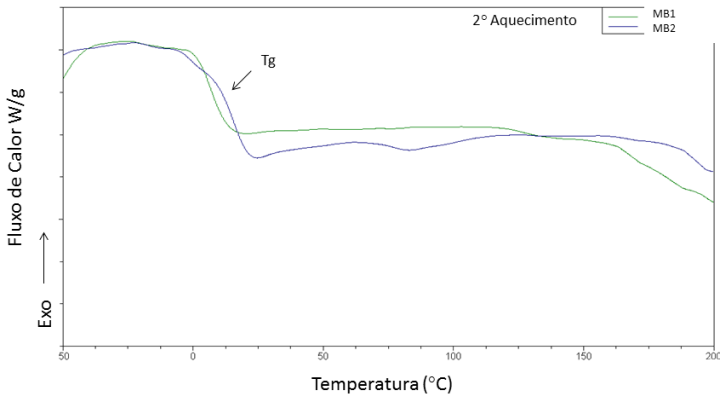


Figura 16 - Curvas de DSC do 2º aquecimento dos biocompósitos MB1 e MB2.



Através do DSC também foi calculada cristalinidade dos compósitos de 48 h de polimerização. A cristalinidade do PLLA pode ser quantificada, ao medir a entalpia de fusão  $H_m$  e cristalização  $H_c$  e considerando  $93,1 \text{ J g}^{-1}$  como a constante para 100 % de cristalinidade (Reddy *et al.*, 2008). Assim, foi determinada uma cristalinidade 7,96 % para os biocompósitos polimerizados 48 h.

### 5.3.5 Degradação hidrolítica

A fim de deduzir como se comportam os biocompósitos produzidos quando submetidos à hidrólise em condições fisiológicas foi feito um estudo de degradação hidrolítica.

Os resultados mostraram que há um rápido processo hidrolítico nos biocompósitos EB1 e EB2. Os resultados indicam que as amostras EB1 e EB2 sofrem perda de massa à velocidade  $k=0,1208 \text{ d}^{-1}$  e  $k=0,04995 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente.

Também foi observado que ao mesmo tempo em que a perda de massa aumenta como consequência da degradação do PLLA, as fibras de CB ficam cada vez mais expostas, propiciando um incremento na absorção hídrica do biocompósito (Figura 17 e Figura 18).

A degradação do PLLA ocorre pela hidrólise das cadeias maiores em cadeias de massa molar menor e em oligômeros, através da cisão das ligações ésteres, formando grupos terminais carboxila e hidroxila (Jahno, 2005). Esta reação de degradação pode ser acelerada pela presença de ácidos ou bases e é afetada pela temperatura e o nível de umidade (Drumright *et al.*, 2000).

De acordo com Barbanti (2005), devido à disposição espacial das cadeias poliméricas a cristalinidade influi na taxa de absorção de água. Assim, a degradação começa pela penetração e difusão das moléculas de água nas regiões amorfas do material e, subsequentemente, ocorre a cisão hidrolítica das ligações ésteres das cadeias poliméricas. A presença de terminais ácidos catalisa a reação de degradação, causando o efeito autocatalítico dos poli( $\alpha$ -hidroxiácidos). Uma vez que os biocompósitos produzidos são amorfos e têm na sua composição fibras de CB altamente hidrofílicas, o processo de absorção de água ocorre rapidamente, o que acelera a velocidade de cisão das ligações éster e, em consequência, aumenta a degradação do biomaterial, ao mesmo tempo em que se potencializa a absorção hídrica.

Figura 17 - Determinação de degradação hídrica (%) de EB1 e EB2 com relação à massa seca (%) inicial.

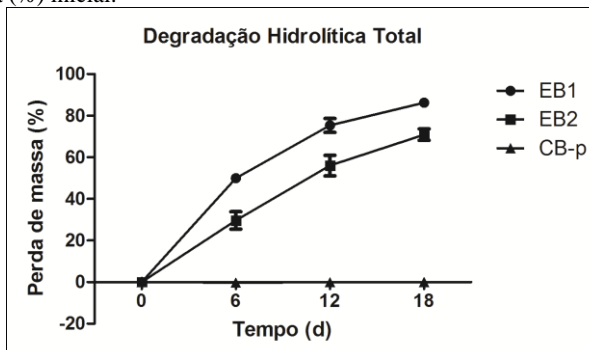
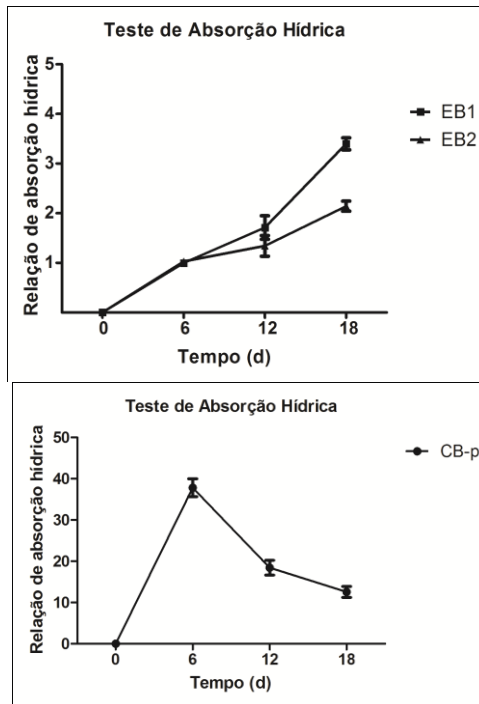


Figura 18 - Determinação de absorção hídrica com relação à massa seca. (A) EB1 e EB2. (B) CB-p.



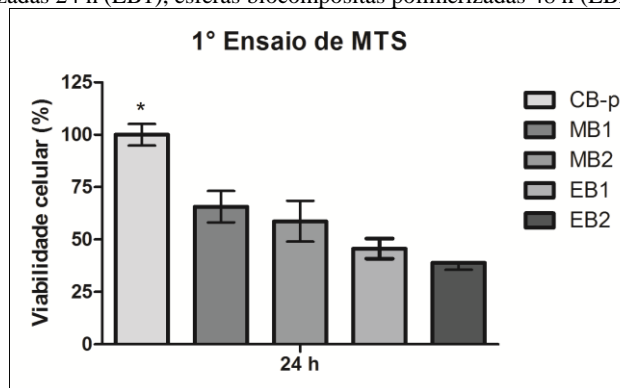
#### 5.4 CITOXICIDADE DOS BIOCOMPÓSITOS

Nos ensaios iniciais de viabilidade celular observaram-se mudanças de coloração no meio, passando de vermelho a amarelo, após alguns minutos de imersão das biocompósitos. Isto sinaliza um processo de acidificação do meio de cultura causado pela presença de resíduos de ácido láctico do processo de policondensação ou uma degradação hidrolítica do PLLA dos biocompósitos, o que não impediu a continuidade dos ensaios de viabilidade celular, por 24 horas. Todavia, como pode ser observado na Figura 19, em todos os biocompósitos produzidos houve uma diminuição na percentagem de células viáveis comparado com matrizes de CB pura. Segundo o estabelecido pela norma ISO10993-5:2009, se houver uma diminuição da viabilidade celular de mais de 30% deve-se considerar um efeito citotóxico do material.

Num segundo ensaio, os controles e as amostras foram hidratados em meio de cultura 24 horas antes de ser feita a semeadura. Do mesmo modo que no primeiro ensaio, foi observada uma mudança na coloração do meio de cultura nos minutos seguintes à imersão dos biocompósitos no meio. Após 24 horas, os controles e as amostras foram lavados com PBS e a cultura de fibroblastos L929 foi repetida de acordo com a metodologia descrita anteriormente; assim, no segundo ensaio de viabilidade celular, foi detectada uma mudança de coloração do meio em apenas uma das doze amostras analisadas.

Os resultados deste ensaio são apresentados na Figura 20. Como pode ser observado, novamente houve uma diminuição significativa na viabilidade celular em comparação com a CB-controle. Conclui-se, portanto, que, conforme o estabelecido pela norma ISO 10993-5:2009, o material biocompósitos produzido tem um efeito citotóxico nas células L929.

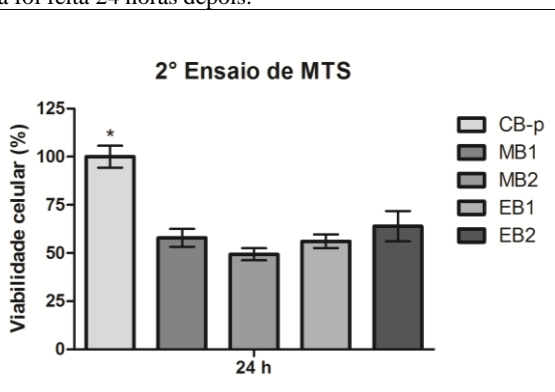
Figura 19 - Resultados de Ensaio de MTS dos biocompósitos produzidos. Celulose bacteriana pura (CB-p), membranas biocompósitas polimerizadas 24 h (MB1), membranas biocompósitas polimerizadas 48 h (MB2), esferas biocompósitas polimerizadas 24 h (EB1), esferas biocompósitas polimerizadas 48 h (EB2).



Em ambos os casos, os testes de viabilidade celular mostraram menor viabilidade nos biocompósitos produzidos em comparação com CB pura. Existem várias causas possíveis para este fenômeno; a principal é o processo de acidificação do meio, pela degradação do PLLA de baixa massa molar; além disso, a hidrofobicidade do PLLA pode ter ocasionado uma menor afinidade das células em relação ao controle. A hidrofobicidade tem sido uma das causas limitantes para o uso de suportes com PLA como base (Okamoto e John, 2013). Outro

dos fatores que podem ter levado a uma menor viabilidade celular, é a diminuição da porosidade do biomaterial. Como foi descrito por Stumpf (2013), a viabilidade dos fibroblastos L929 está relacionada com a porosidade, tamanho dos poros, interconectividade, assim como a superfície de contato (micro-rugosidade) do biomaterial em que são cultivadas e como foi observado nas micrografias dos biocompósitos analisados MEV, houve uma diminuição da área superficial do biomaterial, ao diminuir a porosidade da matriz.

Figura 20 - Resultados de Ensaio de MTS. Os biocompósitos e o controle foram mantidos em meio de cultura DMEM por 24 horas antes de realizar o teste. Logo o meio de cultura foi trocado e os Fibroblastos L929 foram semeados e a leitura da absorbância foi feita 24 horas depois.



Como foi dito anteriormente, o PLLA é um material de alta biocompatibilidade, usado amplamente em dispositivos que ficam em contato com fluidos corpóreos ou em implantantes. A não citotoxicidade deste biomaterial tem sido corroborada por diversos estudos. Por exemplo, Sarasua e colaboradores (2011), através de um teste de proliferação celular, com fibroblastos L929, fibroblastos neonatais e queratinócitos humanos neonatais, avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de PLLA e PDLA de elevada massa molecular, cristalizado sob a forma  $\alpha$  e a mistura equimolar de PLLA/PDLA, cristalizado na forma stereocomplexa. Em todos os casos, as células aderiram, proliferaram e não foi detectado um efeito citotóxico em nenhum dos sistemas avaliados. Todavia, houve certa diferença na taxa de proliferação celular entre os fibroblastos L929, neonatais e queratinócitos humanos nos três materiais avaliados. Outro exemplo que pode ser citado, é o caso de fibroblastos L929 e células tronco de medula que foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade de poli(butil-succinato), poli(ácido láctico) e



uma blenda dos dois materiais. Em todos os casos, não foi observado um efeito citotóxico nos fibroblastos L929. Cabe resaltar que não foi observado uma diferença significativa entre a blenda de poli(butil-succinato) e poli(ácido láctico) e poli(ácido láctico) puro (Kun *et al.*, 2012).

Assím, uma vez que o biomaterial está degradando numa velocidade elevada e que o subproduto do processo hidrolítico é o ácido láctico, podemos explicar e confirmar que a acidificação do meio de cultura celular foi causada por ácido láctico proveniente da degradação hidrolítica dos biocompósitos. Esta acidificação diminuiu a viabilidade das células semeadas. Deve ser considerado que, no corpo humano, os fluidos são tamponados de maneira que favorecem a manutenção do pH em torno de 7,4. Também é importante lembrar que os fluidos são constantemente renovados pelos sistemas circulatório e linfático, o que ajuda na eliminação de materiais de degradação e permite regular o pH em valores fisiológicos, situação que é difícil reproduzir no laboratório (Jahno, 2005). Desta forma, existe a possibilidade de ter uma melhor resposta celular com relação aos biocompósitos em um sistema dinâmico.



## 6 CONCLUSÕES

O objetivo geral de produzir bicompostos de PLLA e CB através da polimerização *in situ* dentro do hidrogel de CB foi atingido, através do método de policondensação direta, sem a utilização de catalisadores.

Determinou-se que a 90 °C pode ser feita a polimerização sem causar a desintegração da rede de nanofibras que formam as membranas e miliesferas de celulose bacteriana. Os bicompostos de PLLA/CB produzidos apresentaram uma microestrutura diferente à da CB e PLLA puros. As nanofibras de celulose ficam presas dentro da matriz de PLLA formada, conservando sua distribuição original promovendo uma boa dispersão no bicomposto. Todavia, não foi observada interação química entre a CB e o PLLA produzido.

O bicomposto produzido se apresentou predominantemente amorfo. A temperatura de  $T_g$  do polímero foi reduzida pela presença das nanofibras de celulose, melhorando-se a processabilidade do bicomposto. A análise térmica determinou que a faixa de temperatura de processamento dos bicompostos produzidos fica no intervalo entre 98,5 e 150 °C, uma vez que nesta faixa de temperatura não há considerável perda de massa.

Os resultados dos testes de reidratação e degradação mostraram uma boa hidratabilidade do material, assim como uma rápida degradação hidrolítica, deixando expostas as fibras de celulose bacteriana ao tempo que o polímero degrada o que potencializa a absorção hídrica e acidez da solução

As células apresentam adesão nos bicompostos, mas a proliferação celular com respeito à CB pura é menor. Ao entrar em contato com o meio de cultura, este fica acidificado, e o material apresenta um efeito citotóxico nas condições testadas.



## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar temperaturas de polimerização na faixa de 90 °C a 130 °C, assim como tempos polimerização mais prolongados para verificar a possibilidade de obter um biocompósito com PLLA de peso molecular mais elevado.

Avaliar a rugosidade, porosidade e permeabilidade a vapor dos biocompósitos.

- Avaliar propriedades mecânicas dos biocompósitos para determinar se há influência das fibras de celulose bacteriana em características como resistência e elasticidade na matriz de PLLA.
- Realizar testes de halo de inibição microbiana com os biocompósitos, a fim de avaliar o efeito do ácido láctico sobre microrganismos ao tempo que o biomaterial degrada.
- Realizar testes de processabilidade dos biocompósitos, por exemplo: moagem, extrusão e moldagem.
- Realizar avaliação de adesão e proliferação celular com células resistentes a pHs baixos, como células epiteliais estomacais, células de carcinoma de colo de útero (HeLA) ou células de osteossarcoma humano (HOS).



## REFERÊNCIAS

ACHMAD, F.; YAMANE, K.; QUAN, S.; KOKUGAN, T. Synthesis of polylactic acid by direct polycondensation under vacuum without catalysts, solvents and initiators. **Chemical Engineering Journal**, v. 151, n. 1-3, p. 342-350, Aug 15 2009. ISSN 1385-8947.

ADAMUS, A.; WACH, R. A.; OLEJNIK, A. K.; DZIERZAWSKA, J.; ROSIAK, J. M. Degradation of nerve guidance channels based on a poly(l-lactic acid) poly(trimethylene carbonate) biomaterial. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, n. 4, p. 532-540, 2012. ISSN 0141-3910.

ALMENAR, E.; AURAS, R. Permeation, Sorption, and Diffusion in Poly(Lactic Acid). In: (Ed.). **Poly(Lactic Acid)**: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p.155-179. ISBN 9780470649848.

ARAKI, J.; WADA, M.; KUGA, S.; OKANO, T. Flow properties of microcrystalline cellulose suspension prepared by acid treatment of native cellulose. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 142, n. 1, p. 75-82, 1998. ISSN 0927-7757.

ATHANASIOU, K. A.; NIEDERAUER, G. G.; AGRAWAL, C. M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid polyglycolic acid copolymers. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, p. 93-102, Jan 1996. ISSN 0142-9612.

AURAS, R.; HARTE, B.; SELKE, S. An overview of polylactides as packaging materials. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 9, p. 835-864, Sep 16 2004. ISSN 1616-5187.

AURAS, R.; LIM, L. T.; SELKE, S. E. M.; TSUJI, H. **Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications**. John Wiley & Sons, Inc., 2010. ISBN 9780470293669.

BÄCKDAHL, H.; HELENIUS, G.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; JOHANSSON, B. R.; RISBERG, B.; GATENHOLM, P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2141-2149, 2006. ISSN 0142-9612.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, nº 1, p. 13 - 21, 2005.

BAXTER, L. C.; FRAUCHIGER, V.; TEXTOR, M.; AP GWYNN, I.; RICHARDS, R.; GABIUS, H. J. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. **Eur Cell Mater**, v. 4 p. 1-17, 2002.

BERTI, F. V. **Desenvolvimento de estruturas vasculares endotelizadas em scaffolds de celulose bacteriana**. 2012. 147 Tese (Doutor em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BERTI, F. V.; RAMBO, C. R.; DIAS, P. F.; PORTO, L. M. Nanofiber density determines endothelial cell behavior on hydrogel matrix. **Materials Science and Engineering: C**, n. 0, 2013. ISSN 0928-4931.

CANEVAROLO JR., S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004.

CHENG, Y.; DENG, S.; CHEN, P.; RUAN, R. Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: a review. **Frontiers of Chemistry in China**, v. 4, n. 3, p. 259-264, 2009. ISSN 1673-3495.

CHOUBISA, B.; PATEL, M.; DHOLAKIYA, B. Synthesis and characterization of polylactic acid (PLA) using a solid acid catalyst system in the polycondensation method. **Research on Chemical Intermediates**, v. 39, n. 7, p. 3063-3070, 2013/09/01 2013. ISSN 0922-6168.

DA SILVA, T. R. S. **Desenvolvimento de hidrogéis de celulose bacteriana para cultura de células e permeação de biomoléculas**. 2012. 140 Dissertação (Mestre em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DAYAL, M. S.; GOSWAMI, N.; SAHAI, A.; JAIN, V.; MATHUR, G.; MATHUR, A. Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from *Acetobacter acetii* MTCC 2623. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 12-16, 2013. ISSN 0144-8617.

DE SOUZA, D. J. **ESTUDO DE BIOCOMPÓSITOS DE POLI(L-ÁCIDO LÁCTICO) (PLLA) COM CELULOSE BACTERIANA VISANDO APLICAÇÃO COMO MEMBRANAS BIOMÉDICAS**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenheiro Químico). Engenharia Química, Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), Joinville.



DEV, A.; BINULAL, N. S.; ANITHA, A.; NAIR, S. V.; FURUIKE, T.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Preparation of poly(lactic acid)/chitosan nanoparticles for anti-HIV drug delivery applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 833-838, May 5 2010. ISSN 0144-8617.

DIEZ, S.; DE ILARDUYA, C. T. Versatility of biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for plasmid DNA delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 2, p. 188-197, Jun 2006. ISSN 0939-6411.

DRUMRIGHT, R. E.; GRUBER, P. R.; HENTON, D. E. Polylactic acid technology. **Advanced Materials**, v. 12, n. 23, p. 1841-1846, Dec 1 2000. ISSN 0935-9648.

DUBOIS, P.; COULEMBIER, O.; RAQUEZ, J.-M. **Handbook of Ring-Opening Polymerization**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. 408 ISBN 978-3-527-31953-4.

FRONE, A. N.; BERLIOZ, S.; CHAILAN, J. F.; PANAITESCU, D. M.; DONESCU, D. Cellulose fiber-reinforced polylactic acid. **Polymer Composites**, v. 32, n. 6, p. 976-985, 2011. ISSN 1548-0569.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432-1442, 2013. ISSN 0144-8617.

GARLOTTA, D. A literature review of poly(lactic acid). **Journal of Polymers and the Environment**, v. 9, n. 2, p. 63-84, Apr 2001. ISSN 1566-2543.

GEA, S.; REYNOLDS, C. T.; ROOHPUR, N.; WIRJOSENTONO, B.; SOYKEABKAEW, N.; BILOTTI, E.; PEIJS, T. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9105-9110, 2011. ISSN 0960-8524.

GONG, Y.; ZHOU, Q.; GAO, C.; SHEN, J. In vitro and in vivo degradability and cytocompatibility of poly(l-lactic acid) scaffold fabricated by a gelatin particle leaching method. **Acta Biomaterialia**, v. 3, n. 4, 2007.

GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. **Acta Materialia**, v. 48, n. 1, p. 263-277, Jan 1 2000. ISSN 1359-6454.

GROOT, W.; VAN KRIEKEN, J.; SLIEKERSL, O.; DE VOS, S. Production and Purification of Lactic Acid and Lactide. In: (Ed.). **Poly(Lactic Acid)**: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p.1-18. ISBN 9780470649848.

GU, J.; CATCHMARK, J. M. Impact of hemicelluloses and pectin on sphere-like bacterial cellulose assembly. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 547-557, 2012. ISSN 0144-8617.

GU, S.; YANG, M.; YU, T.; REN, T.; REN, J. Synthesis and characterization of biodegradable lactic acid-based polymers by chain extension. **Polymer International**, v. 57, n. 8, p. 982-986, 2008. ISSN 1097-0126.

GUPTA, B.; REVAGADE, N.; HILBORN, J. Poly(lactic acid) fiber: An overview. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 4, p. 455-482, Apr 2007. ISSN 0079-6700.

HASSOUNA, F.; RAQUEZ, J.-M.; ADDIEGO, F.; DUBOIS, P.; TONIAZZO, V.; RUCH, D. New approach on the development of plasticized polylactide (PLA): Grafting of poly(ethylene glycol) (PEG) via reactive extrusion. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 11, p. 2134-2144, 2011. ISSN 0014-3057.

HIRATA, M.; KIMURA, Y. Structure and Properties of Stereocomplex-Type Poly(Lactic Acid). In: (Ed.). **Poly(Lactic Acid)**: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p.59-65. ISBN 9780470649848.

HU, Y.; CATCHMARK, J. M. Formation and Characterization of Spherelike Bacterial Cellulose Particles Produced by *Acetobacter xylinum* JCM 9730 Strain. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 7, p. 1727-1734, 2010/07/12 2010. ISSN 1525-7797.

IKE, O.; SHIMIZU, Y.; IKADA, Y.; WATANABE, S.; NATSUME, T.; WADA, R.; HYON, S. H.; HITOMI, S. Biodegradation and Antitumor Effect of Adriamycin-Containing Poly(L-Lactic Acid) Microspheres. **Biomaterials**, v. 12, n. 8, p. 757-762, Oct 1991. ISSN 0142-9612.

JAHNO, V. D. **Síntese e caracterização do Poli(L-ácido láctico) para uso como biomaterial**. 2005. Dissertação (Mestre). Programa de Pós-graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

JANORKAR, A. V.; METTERS, A. T.; HIRT, D. E. Modification of Poly(lactic acid) Films: Enhanced Wettability from Surface-Confined Photografting and Increased Degradation Rate Due to an Artifact of the Photografting Process. **Macromolecules**, v. 37, n. 24, p. 9151-9159, 2004/11/01 2004. ISSN 0024-9297.

JARDINI, A. L.; LUNELLI, B. H.; MARTINEZ, G. A. R.; LASPRILLA, A. J. R.; DA SILVA, J. V. L.; FILHO, R. M. **Computer-Aided Tools for Modeling and Simulation in the Biomaterials Production**. Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials (COLAOB). Gramado, Brasil 2010.

JEM, K. J.; POL, J.; VOS, S. Microbial Lactic Acid, Its Polymer Poly(lactic acid), and Their Industrial Applications. In: CHEN, G. G.-Q. (Ed.). **Plastics from Bacteria**: Springer Berlin Heidelberg, v.14, 2010. cap. 13, p.323-346. (Microbiology Monographs). ISBN 978-3-642-03286-8.

JOHN, R.; NAMPOOTHIRI, K.; PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 524-534, 2007. ISSN 0175-7598.

JUNG, Y.; KIM, S. H.; YOU, H. J.; KIM, S. H.; KIM, Y. H.; MIN, B. G. Application of an elastic biodegradable poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold for cartilage tissue regeneration. **Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition**, v. 19, n. 8, p. 1073-1085, 2008. ISSN 0920-5063.

JUNG, Y. K.; KIM, T. Y.; PARK, S. J.; LEE, S. Y. Metabolic engineering of Escherichia coli for the production of polylactic acid and its copolymers. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, n. 1, p. 161-171, 2010. ISSN 1097-0290.

KAIHARA, S.; MATSUMURA, S.; MIKOS, A. G.; FISHER, J. P. Synthesis of poly(L-lactide) and polyglycolide by ring-opening polymerization. **Nature Protocols**, v. 2, n. 11, p. 2767-2771, 2007. ISSN 1754-2189.

KEMALA, T.; BUDIANTO, E.; SOEGIYONO, B. Preparation and characterization of microspheres based on blend of poly(lactic acid) and poly(epsilon-caprolactone) with poly(vinyl alcohol) as emulsifier. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 103-108, 2012. ISSN 1878-5352.

KHUNNONKWAO, P.; BOONTAWAN, P.; HALTRICH, D.; MAISCHBERGER, T.; BOONTAWAN, A. Purification of l-(+)-lactic acid from pre-treated fermentation broth using vapor permeation-assisted esterification. **Process Biochemistry**, n. 0, ISSN 1359-5113.

KIM, E.; SHIN, E. W.; YOO, I.-K.; CHUNG, J. S. Characteristics of heterogeneous titanium alkoxide catalysts for ring-opening polymerization of lactide to produce polylactide. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 298, n. 1–2, p. 36-39, 2009. ISSN 1381-1169.

KIM, E. S.; KIM, B. C.; KIM, S. H. Structural effect of linear and star-shaped poly(L-lactic acid) on physical properties. **Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics**, v. 42, n. 6, p. 939-946, Mar 15 2004. ISSN 0887-6266.

KIM, K. W.; WOO, S. I. Synthesis of High-Molecular-Weight Poly(L-lactic acid) by Direct Polycondensation. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 203, n. 15, p. 2245-2250, 2002. ISSN 1521-3935.

KLAUSS, P. **Desenvolvimento de dispositivos poliméricos implantáveis para a liberação de fármaco fabricados por sinterização seletiva a laser**. 2010. 174 Tese (Doutor). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.-P.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005. ISSN 1521-3773.

KUN, H.; WEI, Z.; XUAN, L.; XIUBIN, Y. Biocompatibility of a Novel Poly(butyl succinate) and Polylactic Acid Blend. **ASAIO Journal**, v. 58, n. 3, p. 262-267 10.1097/MAT.0b013e31824709ee, 2012. ISSN 1058-2916.

LAMPE, K. J.; NAMBA, R. M.; SILVERMAN, T. R.; BJUGSTAD, K. B.; MAHONEY, M. J. Impact of Lactic Acid on Cell Proliferation and Free Radical-Induced Cell Death in Monolayer Cultures of Neural Precursor Cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 6, p. 1214-1223, Aug 15 2009. ISSN 0006-3592.

LASPRILLA, A. J. R. **Síntese do poli-ácido láctico a partir do ácido láctico para aplicação biomédica** 2011. Dissertação (Mestre). Engenharia

Química, Universidade Estadual de Campinas . Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.

LASPRILLA, A. J. R.; MARTINEZ, G. A. R.; LUNELLI, B. H.; JARDINI, A. L.; FILHO, R. M. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 1, p. 321-328, 2012. ISSN 0734-9750.

LEE, K.-Y.; BLAKER, J. J.; BISMARCK, A. Surface functionalisation of bacterial cellulose as the route to produce green polylactide nanocomposites with improved properties. **Composites Science and Technology**, v. 69, n. 15–16, p. 2724-2733, 2009. ISSN 0266-3538.

LIM, L.-T.; CINK, K.; VANYO, T. Processing of Poly(Lactic Acid). In: (Ed.). **Poly(Lactic Acid)**: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p.189-215. ISBN 9780470649848.

LIM, L. T.; AURAS, R.; RUBINO, M. Processing technologies for poly(lactic acid). **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 8, p. 820-852, 2008. ISSN 0079-6700.

LIU, C. X.; YU, W. Y.; CHEN, Z. J.; ZHANG, J.; ZHANG, N. cNGR conjugated poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles for targeted gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 152, p. E155-E157, Nov 30 2011. ISSN 0168-3659.

LOPES, M. S.; JARDINI, A. L.; FILHO, R. M. Poly (Lactic Acid) Production for Tissue Engineering Applications. **Procedia Engineering**, v. 42, n. 0, p. 1402-1413, 2012. ISSN 1877-7058.

MADHAVAN NAMPOOTHIRI, K.; NAIR, N. R.; JOHN, R. P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8493-8501, 2010. ISSN 0960-8524.

MALMGREN, T.; MAYS, J.; PYDA, M. Characterization of poly(lactic acid) by size exclusion chromatography, differential refractometry, light scattering and thermal analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 83, n. 1, p. 35-40, 2006. ISSN 1388-6150.

MARTÍNEZ-SANZ, M.; LOPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Optimization of the nanofabrication by acid hydrolysis of bacterial cellulose

nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 228-236, 2011. ISSN 0144-8617.

MEHTA, R.; KUMAR, V.; BHUNIA, H.; UPADHYAY, S. N. Synthesis of poly(lactic acid): A review. **Journal of Macromolecular Science-Polymer Reviews**, v. C45, n. 4, p. 325-349, Oct-Dec 2005. ISSN 1532-1797.

MEHTA, R.; KUMAR, V.; UPADHYAY, S. N. Mathematical modeling of the poly(lactic acid) ring - Opening polymerization kinetics. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 46, n. 3, p. 257-264, 2007. ISSN 0360-2559.

MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2335-2346, Dec 2000. ISSN 0142-9612.

MIKOS, A. G.; LYMAN, M. D.; FREED, L. E.; LANGER, R. Wetting of poly(l-lactic acid) and poly(dl-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture. **Biomaterials**, v. 15, n. 1, p. 55-58, 1994.

MOON, S. I.; LEE, C. W.; MIYAMOTO, M.; KIMURA, Y. Melt polycondensation of L-lactic acid with Sn(II) catalysts activated by various proton acids: A direct manufacturing route to high molecular weight Poly(L-lactic acid). **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 38, n. 9, p. 1673-1679, 2000. ISSN 1099-0518.

MOON, S. I.; LEE, C. W.; TANIGUCHI, I.; MIYAMOTO, M.; KIMURA, Y. Melt/solid polycondensation of l-lactic acid: an alternative route to poly(l-lactic acid) with high molecular weight. **Polymer**, v. 42, n. 11, p. 5059-5062, 2001. ISSN 0032-3861.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Síntese, caracterização e degradação " in vitro" do Poli(L-ácido láctico). **Polímeros**, v. 16, p. 26-32, 2006. ISSN 0104-1428.

MURARIU, M.; BONNAUD, L.; YOANN, P.; FONTAINE, G.; BOURBIGOT, S.; DUBOIS, P. New trends in polylactide (PLA)-based materials: "Green" PLA-Calcium sulfate (nano)composites tailored with flame retardant properties. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 3, p. 374-381, 2010. ISSN 0141-3910.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8-9, p. 762-798, Aug-Sep 2007. ISSN 0079-6700.

NAVEENA, B. J.; ALTAF, M.; BHADRIAH, K.; REDDY, G. Selection of medium components by Plackett–Burman design for production of l(+)-lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 4, p. 485-490, 2005. ISSN 0960-8524.

OKAMOTO, M.; JOHN, B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10–11, p. 1487-1503, 2013. ISSN 0079-6700.

PAN, H.; JIANG, H.; CHEN, W. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-co-glycolide. **Biomaterials**, v. 27, n. 17, p. 3209-3220, 2006. ISSN 0142-9612.

PERES, L. B. **Obtenção de nanopartículas de PLLA e nanopartículas blenda PLLA/PMMA e PLLA/PS para incorporação de um análogo da isoniazida**. 2012. Dissertação (Mestre em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PÉRTILE, R. A. N. **Estudo in vitro da interação da linhagem de fibroblastos L929 com membranas de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos**. 2007. Dissertação (Mestre em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PETINAKIS, E.; YU, L.; SIMON, G.; DEAN, K. **Natural Fibre Bio-Composites Incorporating Poly(Lactic Acid)**. 2013. 240 ISBN 978-953-51-0938-9.

PHILP, A.; MACDONALD, A. L.; WATT, P. W. Lactate - a signal coordinating cell and systemic function. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 24, p. 4561-4575, Dec 2005. ISSN 0022-0949.

QUERO, F.; NOGI, M.; YANO, H.; ABDULSALAMI, K.; HOLMES, S. M.; SAKAKINI, B. H.; EICHHORN, S. J. Optimization of the Mechanical Performance of Bacterial Cellulose/Poly(l-lactic) Acid Composites. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 2, n. 1, p. 321-330, 2010/01/27 2009. ISSN 1944-8244.

RAMBO, C. R.; RECOUVREUX, D. O. S.; CARMINATTI, C. A.; PITLOVANCIV, A. K.; ANTÔNIO, R. V.; PORTO, L. M. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 4, p. 549-554, 2008. ISSN 0928-4931.

RAQUEZ, J.-M.; HABIBI, Y.; MURARIU, M.; DUBOIS, P. Polylactide (PLA)-based nanocomposites. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10-11, p. 1504-1542, 2013. ISSN 0079-6700.

RASAL, R. M.; HIRT, D. E. Toughness decrease of PLA-PHBHHx blend films upon surface-confined photopolymerization. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 88A, n. 4, p. 1079-1086, Mar 15 2009. ISSN 1549-3296.

RASAL, R. M.; JANORKAR, A. V.; HIRT, D. E. Poly(lactic acid) modifications. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 3, p. 338-356, 2010. ISSN 0079-6700.

RATAJCZAK-ENSELME, M.; ESTEBE, J. P.; DOLLO, G.; CHEVANNE, F.; BEC, D.; MALINOVSKY, J. M.; ECOFFEY, C.; LE CORRE, P. Epidural, intrathecal and plasma pharmacokinetic study of epidural ropivacaine in PLGA-microspheres in sheep model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 1, p. 54-61, May 2009. ISSN 0939-6411.

RATNER, B. D. Surface Modification of Polymers for Biomedical Applications - Chemical, Biological and Surface Analytical Challenges. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 209, p. 1-Poly, Apr 2 1995. ISSN 0065-7727.

RAVICHANDRAN, R.; VENUGOPAL, J. R.; SUNDARRAJAN, S.; MUKHERJEE, S.; SRIDHAR, R.; RAMAKRISHNA, S. Composite poly-l-lactic acid/poly-( $\alpha,\beta$ )-dl-aspartic acid/collagen nanofibrous scaffolds for dermal tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 6, p. 1443-1451, 2012. ISSN 0928-4931.

RECOUVREUX, D. O. S. **Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos**. 2008. 145 Tese (Doutor em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.



REDDY, G.; ALTAF, M.; NAVEENA, B. J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E. V. Amyolytic bacterial lactic acid fermentation - A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 22-34, Jan-Feb 2008. ISSN 0734-9750.

REDDY, M. M.; VIVEKANANDHAN, S.; MISRA, M.; BHATIA, S. K.; MOHANTY, A. K. Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10-11, p. 1653-1689, 2013. ISSN 0079-6700.

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. In situ modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1717-1723, 2013. ISSN 0144-8617.

SANTOS, D. V. D. **Estudo das propriedades mecânicas de compósitos a base de poli(L-ácido láctico) e nano-hidroxiapatita obtidos por extrusão**. 2011. 140 Dissertação (Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SARASUA, J. R.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, N.; ZUZA, E.; PETISCO, S.; CASTRO, B.; DEL OLMO, M.; PALOMARES, T.; ALONSO-VARONA, A. Crystallinity assessment and in vitro cytotoxicity of polylactide scaffolds for biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 11, p. 2513-2523, 2011/11/01 2011. ISSN 0957-4530.

SERRA, T.; ORTIZ-HERNANDEZ, M.; ENGEL, E.; PLANELL, J. A.; NAVARRO, M. Relevance of PEG in PLA-based blends for tissue engineering 3D-printed scaffolds. **Materials Science and Engineering: C**, v. 38, n. 0, p. 55-62, 2014. ISSN 0928-4931.

SHAH, N.; UL-ISLAM, M.; KHATTAK, W. A.; PARK, J. K. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1585-1598, 2013. ISSN 0144-8617.

SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 9, p. 1254-1276, 2011. ISSN 0079-6700.

SIQUEIRA, J. D. F. **Prospecção e síntese de poli(ácido láctico) para desenvolvimento de suportes na engenharia tecidual** 2011. (Mestrado). Faculdade de Engenharia Química - FEQ, Universidade Estadual de Campinas Campinas, SP.

SÖDERGÅRD, A.; STOLT, M. Industrial Production of High Molecular Weight Poly(Lactic Acid). In: (Ed.). **Poly(Lactic Acid)**: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p.27-41. ISBN 9780470649848.

SOUZA, D. J.; SAYUMI, M.; PÉRTILE, R. A. N.; PORTO, L. M.; PEZZIN, A. P. T. **Estudo de biocompósitos de poli(L-ácido láctico) (PLLA) com celulose bacteriana (CB) visando aplicação como membranas biomédicas.** . XII Congresso Brasileiro de Polímeros - CBPOL 2013. Florianópolis 2013.

STANDARDIZATION, I. O. F. **Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. ISO 10993-5:2009: 34 p. 2009.

STUMPF, T. R.; PÉRTILE, R. A. N.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Enriched glucose and dextrin mannitol-based media modulates fibroblast behavior on bacterial cellulose membranes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 18, p. 4739–4745, 2013. ISSN 0928-4931.

TAMS, J.; JOZIASSE, C. A. P.; BOS, R. R. M.; ROZEMA, F. R.; GRIJPMMA, D. W.; PENNING, A. J. High-Impact Poly(L/D-Lactide) for Fracture Fixation - in-Vitro Degradation and Animal Pilot-Study. **Biomaterials**, v. 16, n. 18, p. 1409-1415, Dec 1995. ISSN 0142-9612.

TORRES, C.; BERNABE, M.; OTERO, C. Enzymatic synthesis of lactic acid derivatives with emulsifying properties. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 4, p. 331-334, Feb 2000. ISSN 0141-5492.

VINK, E. T. H.; RABAGO, K. R.; GLASSNER, D. A.; GRUBER, P. R. Applications of life cycle assessment to NatureWorks (TM) polylactide (PLA) production. **Polymer Degradation and Stability**, v. 80, n. 3, p. 403-419, Jun 2003. ISSN 0141-3910.

WANG, Y.-Q.; CAI, J.-Y. Enhanced cell affinity of poly(l-lactic acid) modified by base hydrolysis: Wettability and surface roughness at nanometer scale. **Current Applied Physics**, v. 7, Supplement 1, n. 0, p. e108-e111, 2007. ISSN 1567-1739.

WATANABE, K.; TABUCHI, M.; MORINAGA, Y.; YOSHINAGA, F. Structural Features and Properties of Bacterial Cellulose Produced in Agitated Culture. **Cellulose**, v. 5, n. 3, p. 187-200, 1998/09/01 1998. ISSN 0969-0239.

WEE, Y. J.; KIM, J. N.; RYU, H. W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 163-172, Apr-Jun 2006. ISSN 1330-9862.

YU, L.; PETINAKIS, E.; DEAN, K.; LIU, H. Poly(Lactic Acid)/Starch Blends. In: (Ed.). **Poly(Lactic Acid)**: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p.217-226. ISBN 9780470649848.

ZHANG, Y.; CHAN, H. F.; LEONG, K. W. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 104-120, 2013. ISSN 0169-409X.



## APÊNDICE A

Espectro de absorção de PLLA cristalino obtido por Motta e colaboradores (2006).

