

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais



Tese

**Sistema de liberação de fármaco a base de membranas de celulose
nanocristalina**

Ananda Morais Barbosa

Pelotas, 2017

Ananda Morais Barbosa

**Sistema de liberação de fármaco a base de membranas de celulose
nanocristalina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Neftalí Lenin Villarreal Carreño

Coorientador: Prof. Dr. Jalel Labidi

Pelotas, 2017

Ananda Moraes Barbosa

**Sistema de liberação de fármaco a base de membranas de celulose
nanocristalina**

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em
Ciência e Engenharia de Materiais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 23/10/2017

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Neftalí Lenin Villarreal Carreño (Orientador) - Doutor em Química pela
Universidade Federal de São Carlos.

.....
Prof^a. Dr^a. Giana da Silveira Lima - Doutora em Odontologia pela Universidade
Federal de Pelotas.

.....
Prof^a. Dr^a. Cristiane Wienke Raubach Ratmann- Doutora Química pela
Universidade Federal de São Carlos.

.....
Prof. Dr. Claudio Martin P. de Pereira - Doutor em Química pela Universidade
Federal de Santa Maria.

.....
Prof^a. Dr^a. Silvana Inês Wolke- Doutora em Química pela Universidade Estadual
de Campinas.

Esta tese foi redigida de acordo com o Manual para elaboração de Trabalhos Acadêmicos da Universidade Federal de Pelotas seguindo o nível de descrição tradicional, em conformidade com o regimento do Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.

**Dedico este trabalho aos entes queridos já
falecidos.**

Agradecimentos

Aos meus pais, José Darci (*in memorian*) e Lindamir, por tudo em minha vida, em especial por me ensinarem o valor e a importância do estudo;

Ao meu companheiro Rafael pelo apoio incondicional e confiança;

Aos meus sogros pelo carinho, incentivo e por torcerem pela minha vitória, mesmo nos momentos difíceis;

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e bolsa PDSE;

Ao professor Neftalí Lenin Villarreal Carreño pela orientação e pelos conselhos durante a pós-graduação;

Ao professor Jalel Labidi por me orientar durante o período de doutorado sanduíche na Universidade do País Basco e pela oportunidade única de crescimento acadêmico;

Aos professores e funcionários do PPGCEM/UFPel pelo auxílio durante a pós-graduação;

Aos professores do PPGO/UFPel, Rafael Lund, Adriana da Silva e Evandro Piva, e seus orientados, Juliana Ribeiro e Wellington Rosa, pelo auxílio nas análises microbiológicas e citotóxicas;

Aos queridos colegas de grupo Novonano por todo auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho, por dividirem e ajudarem a superar as dificuldades;

Aos colegas de grupo BioRP “Biorefinery Processes” por me receberem e auxiliarem na pesquisa;

Agradeço aos meus amigos pelo apoio e carinho, em especial à Daniela por ser minha companheira nos momentos alegres (e também nos difíceis) durante o período de doutorado sanduíche;

E, finalmente, agradeço à todos que de alguma forma ajudaram a concluir com êxito este doutorado.

*“Pedras no caminho? Eu guardo todas.
Um dia vou construir um castelo”.
(Augusto Cury)*

Resumo

BARBOSA, Ananda Moraes. **Sistema de liberação de fármaco a base de membranas de celulose nanocristalina**. 2017. 193f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

A celulose é um dos polímeros naturais mais abundantes na Terra e a utilização de materiais oriundos de fontes renováveis vem despertando o interesse de inúmeras pesquisas pelo seu apelo ecológico. Por outro lado, a tecnologia de liberação de fármacos representa uma das fronteiras da ciência, envolvendo diferentes aspectos multidisciplinares e contribuindo para o avanço da saúde humana. Desta maneira, este trabalho visou o desenvolvimento de um sistema de liberação de fármaco a base de celulose nanocristalina (CNC) oriunda de recurso renovável. Para isto, a nanocelulose foi obtida a partir do linho e caracterizada por diferentes técnicas, tais como: Difração de Raios-x, Microscopia de Força Atômica, Potencial Zeta, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Ressonância Magnética Nuclear, entre outras. Posteriormente, por meio da inserção do fármaco clorexidina na suspensão de nanocristais de celulose formou-se uma membrana. As membranas obtidas foram caracterizadas por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Ressonância Magnética Nuclear, Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Força Atômica. A avaliação da taxa de liberação do fármaco foi realizada por meio da técnica Espectroscopia de luz ultravioleta-visível (UV-vis). A atividade antibacteriana (*S. aureus*) e a citotoxicidade (fibroblastos L929) foram avaliadas e os resultados demonstraram que as membranas de nanocristais de celulose são eficientes sistemas de liberação de fármaco.

Palavras-chave: celulose nanocristalina; biomaterial; material bioativo; liberação de fármacos; clorexidina

Abstract

BARBOSA, Ananda Morais. **Drug release system based on nanocrystalline cellulose membranes.** 2017. 193f. Thesis (Doctor Degree in Materials Science and Engineering) - Graduate Program in Materials Science and Engineering, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2017.

Cellulose is an abundant natural polymer and materials from renewable sources has motivated a number of studies because it is eco-friendly. On the other hand, the drug release technology represents one of the boundaries of science, involving different multidisciplinary aspects and contributing to the advancement of human health. This work aimed the development of a drug release system based on nanocrystalline cellulose (CNC), derived from a renewable resource. For this, the nanocelulose was obtained from flax and characterized by different techniques, such as: X-Ray Diffraction, Atomic Force Microscopy, Zeta Potential, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Magnetic Resonance Nuclear, among others. Subsequently, through the insertion of drug chlorhexidine into the suspension of cellulose nanocrystals a membrane was formed. The obtained membranes were characterized by Infrared Spectroscopy with Fourier Transform (FT-IR), Nuclear Magnetic Resonance, Scanning Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy. The evaluation of the rate of drug release was performed using the Ultraviolet-visible spectroscopy technique. Antibacterial activity (*S. aureus*) and cytotoxicity (L929 fibroblasts) were evaluated and the results demonstrated that cellulose nanocrystals membranes are efficient drug delivery systems.

Keywords: nanocrystalline cellulose; biomaterial; bioactive material; drug release; chlorhexidine

Lista de Figuras

Figura 1 Molécula da celulose.....	20
Figura 2 Estrutura resultante da hidrólise da celulose.....	22
Figura 3 Molécula de clorexidina.	27
Figura 4 Esquema da configuração das regiões cristalinas e amorfas da celulose e da remoção das regiões desordenadas após a hidrólise com ácido sulfúrico e a obtenção dos nanocristais de celulose.....	29
Figura 5 Ionização do ácido sulfúrico em meio aquoso (a), a substituição das hidroxilas da celulose por grupos bissulfato (b) e detalhe dos elétrons livres do grupo bissulfato, prováveis responsáveis pela interação com a clorexidina (c).	30
Figura 6 Interação entre a molécula da clorexidina (abaixo) e a molécula do nanocristal de celulose (acima).	30
Figura 7 Aparência do linho como recebido (esquerda) e da celulose obtida após deslignificação e branqueamento (direita).....	31
Figura 8 Esquema para obtenção de nanocelulose (adaptado de BRINCHI et al., 2013).	32
Figura 9 Difrátogramas de Raios-x da CNC obtida em diferentes tempos e temperaturas de hidrólise.	45
Figura 10 Histogramas da distribuição de tamanho dos nanocristais obtidos mediante as diferentes condições de hidrólise.	46
Figura 11 Espectros FTIR do linho (esquerda) e da celulose (direita).	48
Figura 12 Espectros FTIR do fármaco clorexidina, das membranas de CNC com diferentes concentrações de clorexidina e da membrana de CNC sem clorexidina.	49

Figura 13 Espectros RMN dos nanocristais de celulose após as diferentes condições de hidrólise.....	50
Figura 14 Espectros RMN da clorexidina, da membrana de CNC com 0,015g de clorexidina e da membrana de CNC sem clorexidina. A direita, estrutura da clorexidina (acima) e dos nanocristais obtidos pela hidrólise da celulose com ácido sulfúrico (abaixo).....	51
Figura 15 Imagens MFA dos nanocristais de celulose após diferentes condições de hidrólise.....	52
Figura 16 Imagens de MFA das membranas.	53
Figura 17 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das membranas de nanocristais de celulose pura e com a inserção de diferentes concentrações do fármaco clorexidina.	55
Figura 18 Gráfico da atividade antibacteriana (<i>S. aureus</i>) da clorexidina.	56
Figura 19 Gráfico da sobrevivência de <i>S. aureus</i> ATCC 19095 após teste de contato direto modificado.	57
Figura 20 Viabilidade celular e desvio padrão (%) para as membranas de nanocristais de celulose sem e com clorexidina (CHX) em diferentes concentrações.....	58
Figura 21 Perfil de liberação do fármaco clorexidina: A) membrana de nanocristais de celulose + 0,015g de CHX; B) membrana de nanocristais de celulose + 0,0015g de CHX; C) membrana de nanocristais de celulose + 0,00015g de CHX.....	59

Lista de Tabelas

Tabela 1 Composição química do linho.....	41
Tabela 2 Rendimento na produção dos nanocristais de celulose variando tempo e temperatura de hidrólise em ultrassom.	42
Tabela 3 Índice de cristalinidade.	44
Tabela 4 Valores de potencial zeta dos nanocristais de celulose obtidos por diferentes condições de hidrólise.	47
Tabela 5 Rugosidade média das membranas.	54
Tabela 6 Cronograma de atividades desenvolvidas durante o doutorado.....	61

Sumário

1 Introdução	16
2 Objetivos	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 Revisão de Literatura	20
3.1 Celulose e Nanocelulose	20
3.2 Compósitos Poliméricos	22
3.3 Biomateriais e Materiais Bioativos	23
3.3.1 Sistemas de liberação de fármaco	25
3.3.1.1 Clorexidina	27
3.4 Interação dos nanocristais de celulose com a clorexidina	28
4 Material e Métodos	31
4.1 Obtenção de nanocelulose	31
4.1.1 Deslignificação	31
4.1.2 Obtenção dos nanocristais de celulose	31
4.2 Obtenção das membranas de nanocristais de celulose	32
4.3 Caracterização da nanocelulose e das membranas	33
4.3.1 Composição química do linho	33
4.3.2 Análise gravimétrica	34
4.3.3 Difração de Raios X	34

4.3.4 Espectrometria no Infravermelho	35
4.3.5 Ressonância Magnética Nuclear.....	35
4.3.6 Microscopia de Força Atômica (AFM)	35
4.3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	36
4.4 Avaliação das membranas como sistema de liberação de fármaco	36
4.4.1 Avaliação do Fármaco	36
4.4.2 Determinação da Atividade Antibacteriana das Membranas	38
4.4.3 Ensaio de viabilidade celular	39
4.4.4 Perfil de Liberação	39
5 Resultados e Discussão	41
5.1 Composição química do linho	41
5.2 Análise gravimétrica	42
5.3 Difração de Raios X.....	43
5.4 Determinação de tamanho de partícula e Potencial zeta.....	45
5.5 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	47
5.6 Ressonância Magnética Nuclear.....	49
5.7 Microscopia de Força Atômica (MFA)	51
5.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	54
5.9 Determinação da Atividade Antibacteriana das Membranas.....	56
5.10 Viabilidade celular.....	57
5.11 Cinética de Liberação	58

6 Conclusões	60
7 Cronograma	61
8 Colaborações e Suporte Financeiro	62
Referências	63
Apêndices	74

1 Introdução

As pesquisas envolvendo biomateriais vem crescendo consideravelmente nos últimos anos com o objetivo de aumentar a qualidade e a expectativa de vida. Além disto, a maioria dos biomateriais utilizados no Brasil são importados e, conseqüentemente, são adquiridos por um elevado custo. Assim, é importante que pesquisas sejam realizadas visando a obtenção de novas tecnologias para o desenvolvimento de biomateriais que contribuam para a melhoria da qualidade e aumento da expectativa de vida a um custo reduzido. Desta forma, diversas pesquisas estão sendo voltadas para o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos.

A produção de materiais inovadores que utilizam recursos biológicos renováveis e abundantes é um desafio importante na ciência dos materiais (SAITO et al., 2014). Existe uma crescente demanda por produtos oriundos de recursos renováveis, sustentáveis e não baseados em petróleo. A celulose é uma alternativa pois trata-se de um polímero renovável, biodegradável e não tóxico (DUFRESNE, 2013).

Os biopolímeros são exemplos bem conhecidos de materiais oriundos de fonte renovável e ambientalmente corretas. Estes incluem polissacáridos, tais como celulose, amido, alginato, quitina/quitosano, polímeros de hidratos de carbono produzidos por bactérias e fungos e biopolímeros de animais à base de proteínas, tais como lã, seda, colagénio e gelatina. Polímeros de origem natural oferecem propriedades interessantes de biocompatibilidade e biodegradabilidade (OKAMOTO; JOHN, 2013).

Uma das vantagens dos polímeros naturais é o reconhecimento biológico que pode apoiar positivamente a adesão e função celular, no entanto, muitos desses polímeros possuem propriedades mecânicas pobres e também estão limitados na oferta, podendo se tornar caros (OKAMOTO; JOHN, 2013).

Os polímeros com aplicação biológica têm sido extensivamente estudados em campos biomédicos como biossensores, na engenharia de tecido neural e em eletrodos neurais (LUO et al., 2013).

Neste sentido, nanocristais de celulose, também reportados na literatura como *whiskers*, nanofibras, nanocelulose, cristalitos ou cristais de celulose, são

os domínios cristalinos das fibras celulósicas isolados por meio de hidrólise ácida, e são assim chamados devido as suas características físicas de rigidez, de espessura e de comprimento (SOUZA; BORSALI, 2004).

Entre os vários tipos de nanopartículas, a nanocelulose ganha importância devido à sua natureza renovável, benéfica ao meio ambiente e de baixo custo (THAKUR, 2014). As propriedades da nanocelulose, tais como: biocompatibilidade, baixa toxicidade, biodegradabilidade, excelentes propriedades mecânicas e estabilidade térmica fazem deste material um candidato único para aplicações médicas, especialmente implantes artificiais, curativos, veículos para medicamentos e dispositivos médicos (SOUZA et al., 2010).

A nanocelulose tem gerado grande interesse devido às suas dimensões nanométricas e propriedades, incluindo o módulo de elasticidade (150 GPa), coeficiente de expansão térmica axial (10^{-7} K^{-1}) e área superficial específica (JIANG; HSIEH, 2013).

As aplicações dos materiais nanocelulósicos são variadas, dentre elas estão seu uso em meios de filtragem, aplicações biomédicas, por exemplo, em membranas de diálise (NYSTROM et al., 2010), em agentes de enchimento em materiais compósitos, devido suas propriedades mecânicas, tais como: baixa permeabilidade a gases e reforço da capacidade de rigidez. Materiais nanocelulósicos também podem ser usados como reforços para adesivos, componentes de dispositivos eletrônicos, biomateriais e espumas (MORAIS et al., 2013).

Nos últimos anos, a busca por materiais ecologicamente corretos têm levado a atenção para o desenvolvimento de compósitos biodegradáveis derivados de plantas. Por essas razões o uso da celulose está tão evidenciado, já que é um bom material de reforço devido à sua disponibilidade, baixo custo, baixa densidade, não toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (THAKUR, 2014).

Neste sentido, é importante abordar o uso da nanocelulose em materiais funcionais e bioativos na medicina. A literatura relata a aplicação da celulose nanoestruturada em implantes médicos, engenharia de tecidos, entrega de

farmacos, curativos para feridas, aplicações cardiovasculares e outras aplicações médicas (CARREÑO et al., 2017).

Desta forma, o estudo de biomateriais e suas aplicações médicas evidenciam a importância da nanocelulose no desenvolvimento de produtos inovadores que tenham aplicações médicas e veterinárias. No entanto, para aplicações médicas, devem ser realizados estudos para avaliar se o material pode ser utilizado (SOUZA et al., 2010).

Um material bioativo pode ser usado na liberação de drogas no organismo. Os sistemas de entrega de fármaco têm sido amplamente estudados, com notável aplicação farmacêutica e/ou biomédica (DRURY; MOONEY, 2003).

O desenvolvimento de materiais alternativos compõe um amplo campo de pesquisa. A proposta principal é utilizar recursos biológicos renováveis para obtenção de um material avançado que apresente características inovadoras e com aplicações biológicas.

Neste estudo, a nanocelulose foi aplicada como biomaterial. Para isso, a nanocelulose na forma de suspensão de nanocristais de celulose teve o fármaco clorexidina adicionado e seu uso como material bioativo avaliado como sistema de liberação de fármaco.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Obtenção de um sistema de liberação de fármaco a base de membranas de celulose nanocristalina oriunda de recursos renováveis.

2.2 Objetivos Específicos

- Síntese de nanocelulose a partir de linho (*Linus usitatisimum*) por meio de diferentes condições de hidrólise ácida;
- Síntese do biomaterial - obtidos com a inserção do fármaco clorexidina na suspensão de nanocelulose;
- Caracterização dos materiais obtidos por diferentes técnicas (Espectrometria no Infravermelho, Espectrometria no Ultravioleta-Visível, Ressonância Magnética Nuclear, Difração de Raios-X, Potencial Zeta, Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Eletrônica de Transmissão);
- Avaliação dos biocompósitos como material bioativo e sistema de liberação de fármaco (Determinação da Atividade Antimicrobiana, Citotoxicidade do Material e o Perfil de Liberação do fármaco).

3 Revisão de Literatura

3.1 Celulose e Celulose Nanocristalina

A celulose é o composto orgânico mais abundante na natureza. Embora frequentemente derivados de plantas, a celulose também é sintetizada por uma variedade de microorganismos, tais como: bactérias, algas e fungos (LIN et al., 2013). Um dos polímeros naturais mais importantes produzidos na biosfera, a celulose é considerada o polímero renovável mais abundante da Terra. Sua produção anual é estimada em mais de $7,5 \times 10^{10}$ toneladas (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010).

A celulose é amplamente distribuída em plantas, sendo a madeira, constituída por até 50% de celulose, a mais importante fonte de matéria-prima para a celulose. Independentemente da sua fonte, a celulose é constituída por um homopolissacárido linear composto de unidades de β -D-glucopirranose ligados por β -1-4-ligações (BRINCHI et al., 2013). Na figura 1 apresenta-se a união de moléculas β -glicose que origina a celulose.

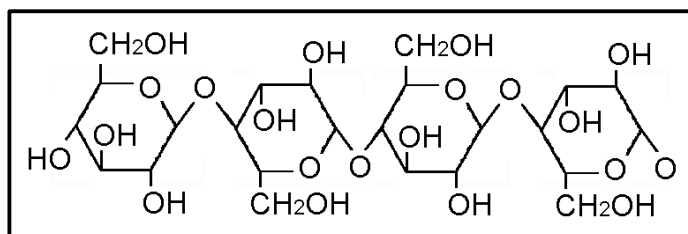


Figura 1- molécula da celulose.

Outras fontes de celulose são as plantas, tais como: linho, juta, cânhamo, bambu, sisal, abacaxi, bananeira, algodão e coco. A celulose também é encontrada em algas e bactérias (KLEMM et al., 2005).

O linho é uma planta de clima temperado da família Linaceae com geralmente um metro de altura; Suas fibras são usadas há milhares de anos para produzir diferentes produtos têxteis. Hoje em dia, o linho tem sido estudado como matéria-prima para a produção de celulose nanoestruturada de alto valor agregado (BARBOSA et al., 2016).

Existe uma ampla gama de tipos de partículas de celulose que estão sendo estudadas para diversas aplicações comerciais. A diversidade de tipos de

partículas de celulose depende da fonte de celulose e dos processos de extração (BRINCHI et al., 2013).

Os cristais de nanocelulose são nanopartículas com alto grau de cristalinidade e alta área específica. Suas propriedades de dimensões e cristalinidade dependem da fonte de fibra e do método de preparação (LIMA; BORSALI, 2002; LIMA et al., 2003), como natureza do ácido, tempo, temperatura e concentração de ácido utilizado na técnica de extração. As dimensões podem variar de 10 a 15 nm de diâmetro e de 300 nm a 2 µm de comprimento (CHEN et al., 2009).

O processo de isolamento e obtenção de nanocelulose a partir de matérias primas celulósicas pode ocorrer em duas fases: a primeira consiste em um pré-tratamento do material de origem que pode envolver a remoção total ou parcial de outros componentes (hemicelulose, lignina, etc) e isolamento das fibras celulósicas. A segunda é um tratamento químico controlado - em geral de hidrólise - para remover as regiões amorfas do polímero de celulose (BRINCHI et al., 2013).

O ácido mais utilizado para hidrólise da celulose é o sulfúrico. As moléculas de ácido sulfúrico são capazes de quebrar as ligações de hidrogênio e penetrar nos domínios cristalinos e não cristalinos do polímero de celulose, originando nanocristais de celulose. Além disso, observa-se a esterificação parcial de grupos hidroxila da celulose e a sua substituição por grupos sulfato. Os principais fatores que causam a dissolução da celulose em soluções de ácido sulfúrico são a ruptura das ligações de hidrogênio e a despolimerização das cadeias macromoleculares (IOELOVICH, 2012).

O mecanismo da hidrólise ácida da celulose envolve a protonação do oxigênio glicosídico. São formados complexos ácido-celulose, com o uso do ácido sulfúrico: $(C_6H_{10}O_5 \cdot 4H_2O \cdot H_2SO_4)_n$ (FAN; GHARPURAY; LEE, 1987) A figura 2 apresenta estrutura resultante da hidrólise, após ocorrer a quebra das ligações β -1-4-glucosídicas.

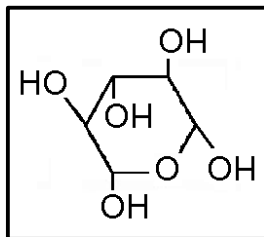


Figura 2- estrutura resultante da hidrólise da celulose.

Por outro lado, os nanocompósitos a base de nanocelulose apresentam um crescente interesse por serem produtos ecologicamente corretos e possuírem as propriedades físicas e químicas da nanocelulose, resultando no aumento de interesse, acadêmico e industrial, para o desenvolvimento de nanocompósitos a base de nanocelulose (THAKUR, 2014).

3.2 Compósitos Poliméricos

Muitas tecnologias modernas exigem materiais com combinações não-usuais de propriedades, as quais não podem ser atendidas pelas ligas metálicas, cerâmicas e materiais poliméricos convencionais. As combinações e as faixas das propriedades dos materiais foram, e continuam sendo, ampliadas pelo desenvolvimento de materiais compósitos (CALLISTER, 2008).

Um compósito pode ser considerado como qualquer material multifásico que exibe uma proporção significativa das propriedades de ambas as fases que o constituem, de tal modo que é obtida uma melhor combinação de propriedades (CALLISTER, 2008).

Em compósitos, as propriedades e a fração volumétrica de cada fase são importantes; também a extensão da conectividade entre fases deve ser conhecida. Normalmente a fase matriz é a fase contínua e a outra é chamada de fase dispersa (ASKELAND; PHULÉ, 2008).

As propriedades dos compósitos são uma função das propriedades das fases constituintes, das suas quantidades relativas e da geometria da fase dispersa. Nesse contexto, por “geometria da fase dispersa”, subentende-se a forma das partículas, seu tamanho, sua distribuição e sua orientação (FARINA, 2012).

Já os materiais poliméricos são constituídos por macromoléculas, produzidas pela união de moléculas menores. A maioria dos polímeros, sólidos ou líquido, possui carbono como base, porém eles também podem ser inorgânicos como os silicones baseados na estrutura de Si-O (ASKELAND; PHULÉ, 2008).

Os polímeros naturais, aqueles que são derivados de plantas e animais, têm sido usados há muitos séculos. Esses materiais incluem a borracha, o algodão, o couro. Proteínas, amidos, enzimas e celulose também são polímeros naturais. Ferramentas modernas de investigação científica tornaram possível a determinação das estruturas moleculares e o desenvolvimento de numerosos polímeros, os quais são sintetizados a partir de moléculas pequenas (CALLISTER, 2008).

Os polímeros também apresentam aplicação biológica e têm sido extensivamente estudados em campos biomédicos como biossensores, na engenharia de tecido neural e em eletrodos neurais (LUO et al., 2013).

Os compósitos são materiais multifásicos em que, geralmente, uma fase (a matriz) é contínua e envolve completamente a outra fase (a fase dispersa). Os compósitos com matriz polimérica (PMC - *Polymer Matrix Composites*) consistem em uma resina polimérica como a matriz, com fibras como o meio de reforço (CALLISTER, 2008).

Neste contexto, a definição de biocompósitos torna-se importante. Biocompósitos podem ser definidos como compósitos que possuem pelo menos um componente derivado a partir de fontes biológicas ou naturais. Há um crescente interesse nestes compósitos, pois eles são biodegradáveis, renováveis, baratos e oriundos de recursos naturais. Biocompósitos, com base nesses atributos, são ecologicamente corretos. No entanto, o teste final para o seu sucesso depende se eles atendem os requisitos da aplicação (CHAWLA, 2011).

3.3 Biomateriais e Materiais Bioativos

Biomaterial é um material utilizado num dispositivo que destina-se a interagir com sistemas biológicos. Por sua vez, a ciência dos biomateriais é o

estudo físico e biológico dos materiais e suas interações com o ambiente biológico. Uma definição complementar é a de biocompatibilidade, que é a capacidade de um material atuar, com uma resposta apropriada do hospedeiro, em uma aplicação específica (RATNER et al., 2003).

A busca pela obtenção de biomateriais com melhores desempenhos e que interajam com os tecidos humanos tem sido alvo de incessantes pesquisas. Assim, biocompatibilidade refere-se à capacidade de um material em desempenhar suas funções provocando uma resposta apropriada no tecido hospedeiro, quando utilizado em aplicações específicas (WILLIAMS, 2008).

Por definição os biomateriais são materiais naturais ou sintéticos, que fazem fronteira com sistemas biológicos e que encontram aplicação em muitos dispositivos médicos, incluindo implantes médicos e dentários ou próteses para reparo, aumento ou substituição de tecidos naturais (BONFIELD, 2002; BÁRTOLO; BIDANDA, 2008).

A condição fundamental para qualquer material sintético ser utilizado como biomaterial é não causar processos inflamatórios e, tampouco propiciar qualquer reação indesejável do corpo. Esta propriedade elementar é conhecida como biocompatibilidade. De modo suplementar, um biomaterial deve resistir a solicitações químicas, térmicas e mecânicas sem substancial deterioração (reação, fratura, abrasão) e, também, não deve alterar o meio biológico nem reagir com o sangue (desnaturação de proteínas), propriedade esta denominada de biofuncionalidade (HENCH, 1998; NICHOLSON, 2002).

Entende-se como biocompatibilidade a capacidade de um material para se desempenhar em uma aplicação específica com uma resposta apropriada do organismo receptor (WILLIAMS, 1987). De acordo com a resposta biológica induzida no organismo, os materiais biocompatíveis podem se classificar em biotoleráveis, bioinertes e bioativos (VALLET-REGÍ, 1997).

Os materiais biotoleráveis são aqueles que provocam uma reação orgânica de encapsulamento fibroso, onde pode se notar a presença de numerosos macrófagos e células fagocitárias, que dominam o quadro histológico; os bioinertes têm uma interação biológica mínima com os tecidos adjacentes e assim a presença do encapsulamento fibroso é, muitas vezes, bastante reduzida; os materiais bioativos interagem ativamente com o organismo

incorporando-se aos tecidos adjacentes sem a formação de membrana de interface, através de verdadeiras ligações químicas (GOMES, 2010).

Ainda podemos citar os materiais bioabsorvíveis ou reabsorvíveis que, após um tempo variável em serviço, são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo (GOMES, 2010).

Em relação a materiais poliméricos, pode-se citar três conceitos ligados aos biomateriais poliméricos: (1) Biodegradável: polímero e dispositivos sólidos que, devido a degradação macromolecular, sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo; (2) Bioabsorvível: materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver em fluídos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição da sua massa molecular; (3) Biorreabsorvíveis: materiais poliméricos que apresentam degradação por meio da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos *in vivo*, além de serem totalmente eliminados e seus subprodutos de degradação, sem efeitos colaterais (COSTA; QUEIROZ, 2013).

Neste sentido, biomateriais celulósicos vem sendo estudados para diversas aplicações biológicas, dentre elas: cosméticos, cartilagens, ossos e tendões artificiais (Carreño et al., 2017).

3.3.1 Sistemas de liberação de fármaco

O objetivo da entrega de um fármaco é a liberação de um agente farmacêutico para a circulação sistêmica, e, conseqüentemente, para o local de ação para produzir o efeito farmacológico desejado (WANG; SIAHAAN; SOLTERO, 2005). Um sistema de liberação deve melhorar ou facilitar a ação de compostos terapêuticos. Idealmente, um sistema de entrega de droga poderia fornecer a quantidade correta de medicamento para o local de ação à taxa e tempo adequados, a fim de maximizar a resposta terapêutica desejada (HILLERY; LLOYD; SWARBRICK, 2005).

A tecnologia de liberação de drogas está se tornando cada vez mais sofisticada e atuais abordagens levam em conta fatores como a influência dos processos farmacocinéticos sobre a eficácia dos medicamentos, bem como a

importância do tempo de liberação e do local de ação dos fármacos (HILLERY; LLOYD; SWARBRICK, 2005).

A liberação de agentes bioativos a partir de materiais poliméricos tem atraído atenção considerável de investigadores em toda a comunidade científica. As tendências em tecnologia de entrega de drogas são os polímeros biodegradáveis que não exigem a remoção cirúrgica após o fornecimento do medicamento (CHASIN; LANGER, 1990).

Os sistemas de liberação de fármacos constituem a maioria das aplicações médicas investigadas para polímeros biodegradáveis. Isto se dá devido esses sistemas serem temporários e não precisarem ser removidos cirurgicamente (RATNER et al., 2003). Alguns dos conceitos que devem ser considerados para os sistemas de liberação de fármacos são: o conceito de biodisponibilidade; o processo de absorção do fármaco; e os processos de farmacocinética. A biodisponibilidade é definida como a taxa e o grau em que um agente ativo é absorvido e se torna disponível no local de ação e, por conseguinte, dá uma resposta terapêutica. O processo de absorção é dependente do modo de administração do fármaco, que pode ser oral, sublingual, nasal, entre outras, mas de forma geral, a droga deve atravessar as interfaces epiteliais adequadas para atingir a circulação. A farmacocinética é o estudo de como os medicamentos entram no corpo, atingem o local de ação e são removidos do corpo (HILLERY; LLOYD; SWARBRICK, 2005).

Nanopartículas aplicadas à liberação de fármacos podem ser de dois tipos de estruturas diferentes, nanoesferas e nanocápsulas. As nanoesferas podem ser definidas como sistemas nanoparticulados de caráter matricial, constituídas por uma rede polimérica, enquanto as nanocápsulas são formadas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso (SCHAFFAZICK et al., 2002).

Recentemente, devido à sua segurança e eficácia, a celulose nanocristalina é estudada para o uso em sistemas de liberação de drogas (como portadores de drogas), devido às suas propriedades atraentes (THAKUR, 2014).

Sistemas de liberação de fármacos utilizando nanocelulose já vem sendo estudados, porém esta nanocelulose, é na maioria dos casos, de origem bacteriana (LACERDA et al., 2013; THAKUR, 2014).

O uso de nanocristais de celulose, derivados da madeira, como transportadores na liberação direcionada de agentes terapêuticos tiveram a toxicidade determinada para as células endoteliais microvasculares do cérebro humano, concluindo que os nanocristais de celulose não são tóxicos para as células endoteliais microvasculares (ROMAN et al. 2010).

3.3.1.1 Clorexidina

A clorexidina (CHX) é um dos agentes antimicrobianos mais eficientes (VERRAEDT et al., 2010). Este medicamento tem sido amplamente utilizado em uma grande variedade de aplicações devido às suas atividades antimicrobianas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e fungos, e não toxicidade em relação às células de mamíferos (CHEN et al., 2008; VERRAEDT et al., 2010; FERNANDES et al., 2014).

A clorexidina é conhecida como padrão-ouro, ao qual outros agentes anti-placa e gengivite são comparados. Sua eficácia pode ser atribuída a seus efeitos bactericidas e bacteriostáticos. As propriedades antimicrobianas da clorexidina são atribuídas a sua estrutura di-catiônica (MOSHREFI, 2002). As partes positivamente carregadas da molécula de CHX reagem com os grupos fosfato de lipopolissacarídeos na parede celular bacteriana gerando a atividade antimicrobiana da CHX (ATTIN et al., 2008). A fórmula química da clorexidina é $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ e sua molécula esta apresentada na figura 3.

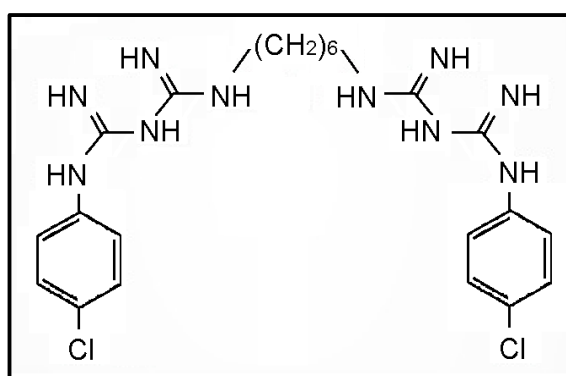


Figura 3- molécula de clorexidina.

O uso da clorexidina anti-séptica como um medicamento terapêutico ou profilático na higiene dental ou periodontal é reportado na literatura (HENNESSEY, 1973). Este fármaco é utilizado em vários produtos para

proteção oral e, em geral, para aplicações odontológicas devido à sua ação anti-séptica e desinfetante de feridas (SCAFFARO et al., 2013; FERNANDES et al., 2014).

Estudos sobre a liberação de CHX já foram realizados (VERRAEDT et al., 2010; CHEN et al., 2008; MENG et al., 2009; MEDLICOTT et al., 1996; FERNANDES et al., 2014), no entanto, nenhum destes trabalhos é dedicado a avaliar a liberação de CHX “carregada” em membranas de nanocristais de celulose.

3.4 Interação dos nanocristais de celulose com a clorexidina

A celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n é um polímero de cadeia longa composto de um só monômero, a glicose. Apresenta estrutura linear na qual se estabelecem múltiplas ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas das cadeias de glicose. Com a hidrólise ácida da celulose, ocorre a quebra das ligações de hidrogênio que mantêm as cadeias da celulose unidas (figura 4) (ROMAN; WINTER, 2004; DOMINGUES; GOMES; REIS, 2014).

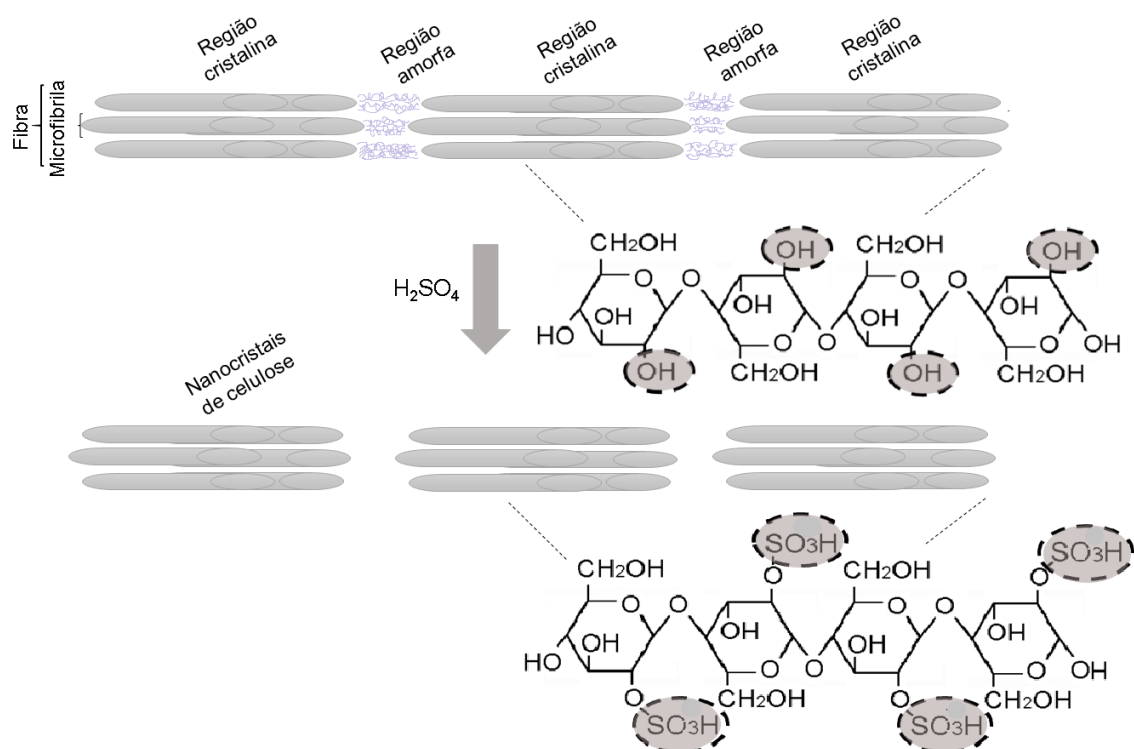
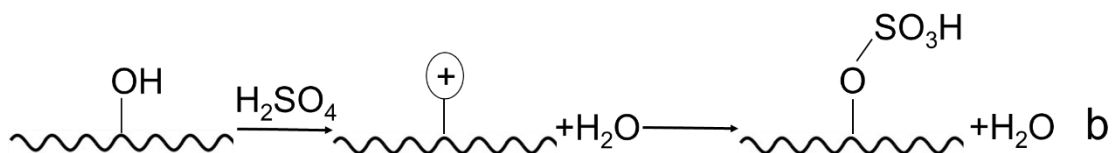
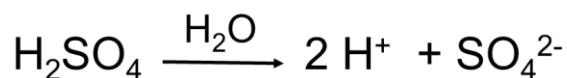
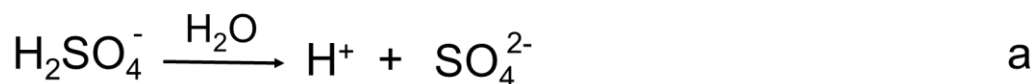
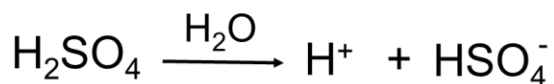
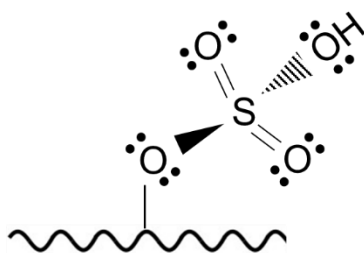


Figura 4- Esquema da configuração das regiões cristalinas e amorfas da celulose e da remoção das regiões desordenadas após a hidrólise com ácido sulfúrico e a obtenção dos nanocristais de celulose. Em destaque, a troca dos grupos hidroxila da celulose pelos íons bissulfato após a hidrólise com ácido sulfúrico.

A interação dos nanocristais de celulose com a clorexidina pode ser melhor compreendida em seu nível molecular. Primeiramente, é necessário entender como ocorre a ionização do ácido sulfúrico em água, em que o produto da ionização completa são dois cátions hidrogênio e um ânion sulfato (figura 5 a). No entanto, a ionização parcial pode prover os ânions bissulfato, envolvidos na interação entre os nanocristais e a clorexidina. Desta forma, durante a hidrólise ácida da celulose, os grupos hidroxila de suas cadeias reagem com os cátions hidrogênio, liberando água, e sendo substituídos pelos ânions bissulfato presentes (figura 5 b). Acredita-se que a interação dos nanocristais de celulose com a clorexidina se realiza devido a existência de elétrons livres no grupo bissulfato que surge após a hidrólise ácida da celulose com ácido sulfúrico (figura 5c).





C

Figura 5- ionização do ácido sulfúrico em meio aquoso (a), a substituição das hidroxilas da celulose por grupos bissulfato (b) e detalhe dos elétrons livres do grupo bissulfato, prováveis responsáveis pela interação com a clorexidina (c).

Por outro lado, a clorexidina possui grupos protonados em sua molécula, sendo esses responsáveis pela interação com os nanocristais de celulose. Os grupos bissulfato contêm oxigênios com pares de elétrons livres, responsáveis por uma alta densidade de elétrons naquela região da molécula, os quais interagem diretamente com o grupo protonado, positivamente carregado, presente na clorexidina (figura 6) (BLACKBURN et al., 2007).

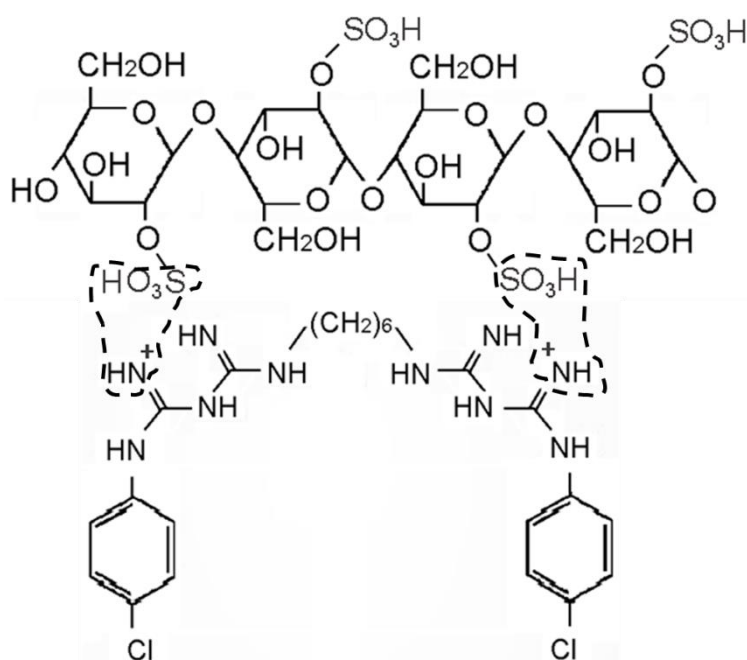


Figura 6- interação entre a molécula da clorexidina (abaixo) e a molécula do nanocristal de celulose (acima).

4 Material e Métodos

4.1 Obtenção de nanocelulose

4.1.1 Deslignificação

O linho (fornecido pela Artic Fiber Company Ltda. Kiiminki, Finlândia) foi aquecido e agitado numa solução de NaOH 1,8 M com uma razão de 1: 20 (peso/volume) a 120°C durante 90 minutos; Isso foi repetido duas vezes para garantir a eliminação da lignina e hemicelulose. Após a deslignificação, a polpa obtida foi filtrada e lavada com água destilada até atingir o pH neutro. O branqueamento foi realizado em duas etapas: primeiro a polpa deslignificada seca foi colocada em solução de NaClO₂ 0,2 M com uma razão de 1:30 (peso/volume) a 75°C por 2 horas e em seguida as fibras foram submergidas numa solução de H₂O₂ 3M com relação 1:10 e pH 11, utilizando sulfato de magnésio (0,2% em peso) para proteger as fibras e o ácido pentético (0,5% em peso) como quelante. A polpa branqueada foi lavada várias vezes até pH neutro e depois seca em estufa a 50 °C por 24 horas (ROBLES et al., 2015). Na figura 7 observa-se a aparência do linho e da celulose.



Figura 7- aparência do linho como recebido (esquerda) e da celulose obtida após deslignificação e branqueamento (direita).

4.1.2 Obtenção dos nanocristais de celulose

A obtenção da nanocelulose, a partir da polpa celulósica de linho, foi realizada da seguinte maneira: (1) hidrólise ácida da celulose, em banho de ultrassom, com ácido sulfúrico a 10,2M na proporção de 1:20 (peso/volume) por 30, 45 ou 60 minutos a 50 ou 60°C; (2) diluição com água a fim de parar a reação e repetidas lavagens com sucessiva centrifugação; (3) diálise com água

destilada para remoção total do ácido; (4) secagem da suspensão para obtenção da nanocelulose sólida a fim de caracterizar o material obtido (BARBOSA et al., 2016). A figura 8 apresenta um esquema para obtenção de nanocristais de celulose.

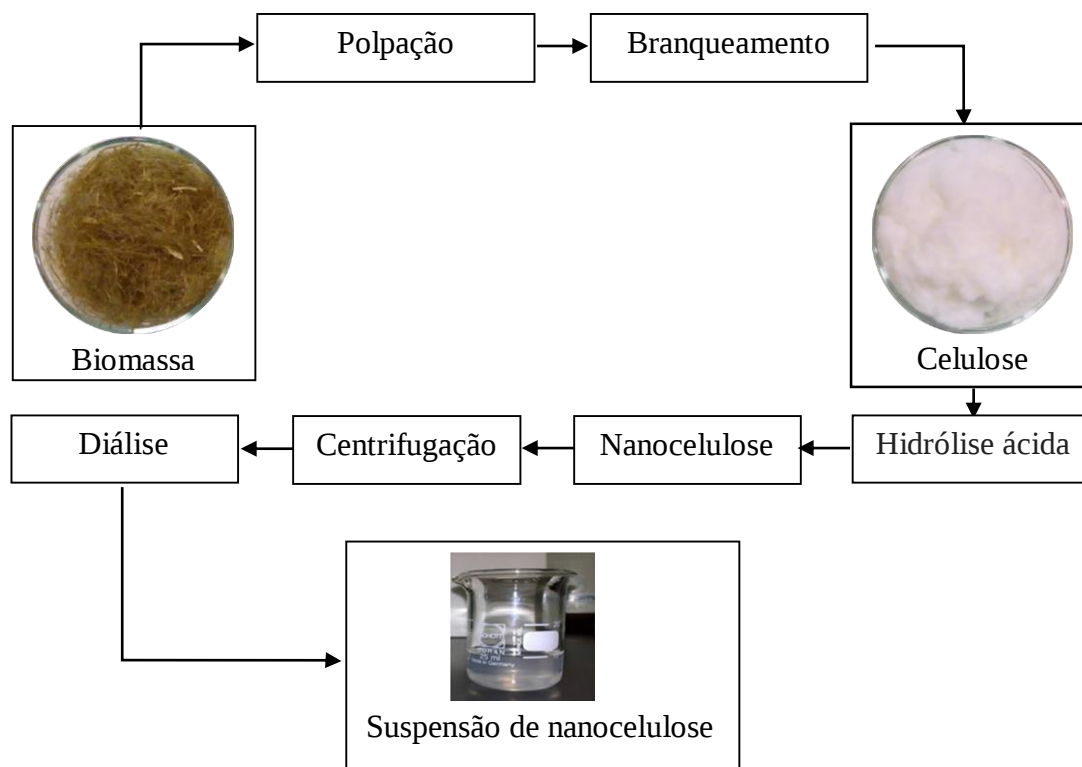


Figura 8- esquema para obtenção de nanocelulose (adaptado de BRINCHI et al., 2013).

4.2 Obtenção das membranas de nanocristais de celulose

Foram utilizadas três concentrações diferentes de CHX para produzir as membranas. A fração de CHX (15mg, 1,5mg ou 0,15mg) foi dissolvida em 0,5 mL de dimetilsulfóxido e depois adicionou-se 10 mL de suspensão de nanocristais de celulose para cada fração de CHX. As suspensões foram agitadas e aquecidas a 50°C durante 3 horas. Por fim, as suspensões foram vertidas em pratos de alumínio e colocadas em estufa a 50°C por 16-20 horas (BARBOSA et al., 2016).

4.3 Caracterização da nanocelulose e das membranas

A seguir estão listadas as caracterizações que foram realizadas neste trabalho.

4.3.1 Composição química do linho

A análise química do linho foi realizada para determinar a quantidade de celulose disponível para extração. Esta caracterização foi realizada de acordo com os métodos padronizados pela *Technical Association of the Pulp and Paper Industry* (TAPPI). Foram realizadas, em seis repetições, as extrações em tolueno-etanol, a determinação da lignina insolúvel, a determinação da holocelulose, bem como das celulose e por diferença, da hemicelulose. Devido ao uso de técnicas de caracterização química de materiais lignocelulósicos, torna-se necessário elucidar alguns conceitos.

Extrativos ou materiais solúveis são os componentes solúveis em solventes orgânicos. A mistura etanol-tolueno, indicada na norma, fornece a remoção mais completa de substâncias extraíveis, que são os sais, substâncias solúveis em água, além de carboidratos de baixo peso molecular, tais como: ceras, ácidos graxos, resinas, fotoesteróis, hidrocarbonetos não voláteis (Norma TAPPI 204 cm-97).

Lignina representa o que é chamado de "material incrustante" formando parte da parede celular e da lamela média de materiais lignocelulósicos. É uma substância aromática e amorfa. Sua estrutura química não foi completamente elucidada. A determinação do teor de lignina é realizada pela determinação dos componentes insolúveis em ácido sulfúrico a 72% voláteis (Norma TAPPI 222 om-98).

Os materiais lignocelulósicos contém uma certa quantidade de carboidratos não celulósicos chamados hemicelulose. A hemicelulose é composta de pentosenos e hexossanos (Norma TAPPI 223 cm-84).

A celulose é classificada em alfa-celulose, indica conteúdo de celulose não degradado e de maior peso molecular na polpa, beta-celulose, indica a celulose degradada, e gama-celulose, consiste principalmente em hemiceluloses. A fração solúvel, composta por beta e gama celulose, é determinada volumetricamente por oxidação com dicromato de potássio e a alfa-

celulose, como fração insolúvel, é obtida pela diferença (Norma TAPPI 203 om-93).

4.3.2 Análise gravimétrica

É um método analítico quantitativo cujo processo envolve a separação e pesagem de um elemento. Os nanocristais de celulose foram mensurados a seco para controlar o rendimento de cada tratamento após a hidrólise, utilizando a seguinte equação:

$$Y = \frac{MC \times MT}{MS \times MO} \quad (1)$$

onde MC é a massa de nanocristais de celulose secos (10-15 min em forno a 105°C); MT é a massa da suspensão total, MS é a massa da suspensão antes de secar e MO é a massa de celulose antes da hidrólise (BARBOSA et al., 2016).

4.3.3 Difração de Raios X

Esta técnica foi empregada para identificar a estrutura do material, sua composição de fases, tamanho dos cristais. Este tipo de análise é utilizada para determinar a estrutura de materiais cristalinos (ASKELAND; PHULÉ, 2008). A difração de raios X foi utilizada para comparar a cristalinidade obtida após cada hidrólise. Os padrões foram coletados com um difractômetro multifuncional Panalytical Philips X'Pert PRO (Almelo, Países Baixos), com amostras montadas em uma bolacha de silício fixada em um suporte de amostra, usando radiação CuK α monocromática ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$), ângulo 2θ Bragg entre 5 e 50°, tamanho do passo de 0,026° e tempo por passo de 80 s à temperatura ambiente. As contribuições cristalinas para o sinal principal foram determinadas com a intensidade observada nos picos cristalinos tradicionais: -110, 110, 200 e 004, enquanto a contribuição amorfa que é atribuída ao sinal amplo observado a $2\theta \approx 18^\circ$ (HE et al., 2008). A equação de Segal foi utilizada para estimar a cristalinidade:

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

Onde CrI é o grau de cristalinidade, I_{200} a máxima intensidade e I_{am} é intensidade de difração em $2\theta \approx 18^\circ$.

4.3.4 Determinação de tamanho de partícula e Potencial zeta

O tamanho de partícula e o potencial zeta foram medidos no Equipamento Nanosizer Malvern Z (Worcestershire, Reino Unido), o índice de refração para celulose foi considerado em 1,47 e as medidas foram realizadas a 25°C. Para análise de tamanho, colocou-se 0,1 gL⁻¹ de suspensão de nanocristais de celulose dentro de uma cubeta de plástico descartável, realizando 13 varreduras com um ângulo de incidência de 173°, repetido três vezes para cada amostra. Para o potencial zeta, as suspensões de nanocristais foram colocadas dentro das células capilares da Malvern e medidas usando o modelo de Smoluchowsky ($\kappa \cdot a = 1,50$). Foram realizadas dez varreduras e foram medidos três espécimes de cada amostra (SMOLUCHOWSKI, 1903).

4.3.5 Espectrometria no Infravermelho

Esta técnica permite uma seletividade espectral capaz de possibilitar determinações de diversos compostos simultaneamente (TREVISAN; POPPI, 2006). Os espectros infravermelhos foram registrados em Espectrômetro Spectrum Two FT-IR fabricado pela Perkin Elmer, Inc. (Londres, Reino Unido). O intervalo definido foi de 800 a 4000cm⁻¹ e a resolução 8cm⁻¹. Para cada amostra, 10 varreduras foram realizadas

4.3.6 Ressonância Magnética Nuclear

Essa técnica de caracterização, não convencional, permite a investigação da relação estrutura - propriedade com maior precisão. Nos nanocompósitos poliméricos o estudo da relação morfologia - propriedade é de grande interesse, pois a busca por respostas com relação à homogeneidade, dispersão de fases e interação entre os componentes (PASSOS et al., 2011). A espectrometria RMN ¹³C CP/MAS foi realizada utilizando um espectrômetro Bruker de 500 MHz (Karlsruhe, Alemanha) a uma frequência de 250 MHz com um tempo de aquisição de 0,011s à temperatura ambiente.

4.3.7 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As imagens de microscopia de força atômica foram obtidas operando em modo *tapping* com um NanoScope IIIa, Multimode TM-AFM do microscópio de

medição Digital Instruments-Veeco (Plainview, NY, EUA), equipado com uma ponta de silício, com uma frequência de 300 kHz. Para obter resultados representativos, diferentes regiões das amostras foram digitalizadas.

4.3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O MEV foi utilizado para a análise da morfologia e micro-estrutura das amostras visto que esta ferramenta de análise revela características da superfície da amostra (CALLISTER, 2008). As membranas de nanocristais de celulose tiveram sua morfologia analisada em Microscópio Eletrônico de Varredura marca SHIMADZU e modelo SSX-550. A corrente do feixe utilizado foi de 1PA e a potência do feixe de 15kv.

4.4 Avaliação das membranas como sistema de liberação de fármaco

4.4.1 Avaliação do Fármaco

Para caracterizar a clorexidina, a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) foram realizadas por meio de técnicas de microdiluição descritas pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (M11-A8) com modificações.

Inóculo

Uma cepa de *S. aureus* ATCC 19095 foi cultivada em condições aeróbicas a 37°C em de infusão de cérebro-coração agar (BHI), durante 24 horas. As colônias de microorganismos foram então suspensas em BHI caldo suplementadas com 10% de sacarose, a fim de fazer uma suspensão de 3×10^8 UFC mL⁻¹. A quantidade de células microbianas foi ajustada através de espectrofotometria (espectrofotômetro, Quimis, Brasil) a 405 nm.

Os microorganismos replicados 24h antes foram suspensos em 5 ml de soro fisiológico estéril de acordo com a escala 0,5 de McFarland ($1,6 \times 10^8$ mo/ml), e depois o valor de microorganismos é ajustado para 10^7 microorganismos/ml, dissolvendo-se 50ul da suspensão inicial em 4,95 ml de soro fisiológico estéril, e 0,125ml desta suspensão diluído em 4,875 ml de meio de cultura RPMI.

Preparo do composto

A clorexidina em forma de pó foi previamente pesada e dissolvida em DMSO com uma concentração de 500 µg·mL⁻¹. A partir dessa solução foi realizada uma diluição seriada onde as soluções foram as concentrações finais de fármaco variaram de 0,97 a 500 µg · mL⁻¹. Posteriormente 20ul das diluições foram suspensos em 1980ul de meio BHI caldo.

Determinação de CIM:

Foram adicionados 100 µL da suspensão de inóculo juntamente com 100 µL de cada diluição do composto em cada poço da placa de microcultura. No controle negativo, foram adicionados 100 µL de solução de microrganismo mais 100 µL de meio Muller Hinton e foram adicionados 100 µL de meio Muller Hinton e 100 µL do produto final no controle positivo. Três repetições foram feitas para cada concentração. Após 24 h de incubação a 35°C, a absorvância de cada poço foi lida em um leitor de microplacas (Thermo Plate TP-Reader, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a um comprimento de onda de 492 nm.

Os pontos de extremidade do CIM foram determinados como a primeira concentração do agente antibacteriano em que a turbidez no poço era mais de 50% menor do que a do poço de controle (PFALLER; MESSER; COFFMAN, 1995). A medida para a atividade antibacteriana, expressada como porcentagem de atividade (%AE), foi calculada acordo com a Equação (3) (FELÍCIO et al., 2008):

$$\%AE = 100 - \left(\frac{AE - AEB}{AC - ACB} \right) \times 100 \quad (3)$$

onde AE representa a absorvância das placas de teste após o tempo de incubação; AEB é a absorvância das placas que contêm meio, amostra e inóculo em t= 0; AC é a absorvância de placas contendo controle negativo (sem veículo) (100% do crescimento do inóculo); e ACB é a absorvância de placas contendo meio de cultura. Todos os valores de CIM foram calculados por regressão não linear (BARBOSA et al., 2016).

Determinação de CBM

Cada inóculo do teste anterior que mostrou crescimento inferior a 50% foi subcultivado em placas de ágar. Após 24 horas de incubação, a leitura foi determinada pelo crescimento visível das cepas. O CBM foi considerado a primeira concentração do agente antibacteriano em que a turbidez no poço era

≥ 50% menor do que a do poço de controle e que não mostrou crescimento no meio de cultura (BARBOSA et al., 2016).

4.4.2 Determinação da Atividade Antibacteriana das Membranas

Foi utilizado um teste de contato direto modificado para avaliar o efeito antimicrobiano. O teste de contato direto modificado (TCDm) consiste na medição do crescimento microbiano cinemático pelo contato próximo entre o microorganismo e o material (ZHANG et al., 2009) usando culturas de bactérias em microplaca de 96 poços.

Anteriormente, as amostras foram esterilizadas por radiação Gamma em um equipamento Eldorado-78 (Atomic Energy of Canada Ltd. (Chalk River, ON, Canadá)). Após a esterilização, os espécimes foram colocados em placas de 96 poços, com n=6 para cada grupo testado.

Cepas bacterianas e condições de cultura

Uma cepa de *S. aureus* ATCC 19095 foi cultivada em condições aeróbicas a 37°C em infusão de cérebro-coração agar (BHI), durante 24 horas. As colônias de microorganismos foram então suspensas em BHI caldo suplementadas com 10% de sacarose, a fim de fazer uma suspensão de 3×10^8 UFC mL⁻¹. A quantidade de células microbianas foi ajustada através de espectrofotometria (espectrofotômetro, Quimis, Brasil) a 405 nm.

A partir deste inóculo foram adicionados 20 µL de suspensão bacteriana em cada poço a ser avaliado. Os materiais foram colocados em poços de microplacas com a ajuda de pinças estérís, sendo uma amostra colocada em cada poço e o material inoculado com 20 µL de suspensão microbiana (*S. aureus* + BHI + sacarose). Os discos foram incubados durante uma ou 24 horas a 37°C e aproximadamente 100% de umidade relativa. Os poços de microplacas contendo o mesmo volume de suspensão bacteriana sem discos de teste também foram incubados como controles. Posteriormente, adicionou-se 180 µL de meio de cultura BHI, (Guangzhou Mekan Trading Co., Ltd., Guangzhou, China) em cada poço e agitou-se durante 10 minutos. Em seguida, 100 µL de suspensão bacteriana de cada poço foram transferidos para diluição. O plaqueamento foi realizado em placas de Petri descartáveis contendo BHI ágar dividido em oito partes. Cada placa recebeu duas gotas de 20µL por diluição e

foi incubada a 37°C durante 24 horas. Após o período de incubação, a concentração das unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹) foi contada (BARBOSA et al., 2016).

4.4.3 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com ISO 10993: 2009. Os fibroblastos de camundongo L929 (2x10⁴/poço) foram mantidos em meio (DMEM) em placas de 96 poços durante 24h. As amostras de membranas de nanocristais de celulose com o fármaco clorexidina, com a dimensão padronizada (5x1mm) e esterelizados, foram previamente incubadas em 1 mL de DMEM a 37°C e pH 7,2 durante 24 h, em condições estáticas para obter os eludatos (n=6). O controle positivo utilizado foi o grupo não tratado (apenas células de fibroblasto em DMEM, sem adição de eludato). Os eludatos dos espécimes foram aplicados em cada poço de placas de 96 poços previamente preparadas com fibroblastos de camundongo. A citotoxicidade produzida por cada grupo diferente foi avaliada com tempo de exposição celular de 24 h. Após a remoção dos eludatos, adicionou-se 180 µL de DMEM a 20 µL de solução de brometo de dimetiazol difeniltetrazólio (MTT) e colocou-se em cada poço. Após 4 h de incubação a 37°C no escuro, o precipitado de azul de formazan foi extraído das mitocôndrias usando 200 µL / poço de DMSO. A absorção foi determinada usando um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm.

A análise estatística dos dados de viabilidade celular (absorvância) foi realizada utilizando o programa SigmaPlot 12 (Systat Inc, San Jose, CA, EUA). A ANOVA, seguida pelo teste de Tukey foi utilizada para analisar a viabilidade celular. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

4.4.4 Perfil de Liberação

Esta análise permite a determinação da quantidade de fármaco liberada ao longo do tempo, revelando uma curva da liberação da fármaco. O perfil de liberação foi monitorado por espectrofotometria no Ultravioleta-Visível. A absorvância do meio foi medida usando um espectrofotômetro UV-Vis V-630 (Jasco Inc. (Tóquio, Japão)). Em primeiro lugar, uma varredura foi realizada nas membranas para determinar o comprimento de onda em que as leituras seriam feitas e o comprimento de onda de 360 nm foi selecionado. Em seguida, várias

diluições foram realizadas obtendo várias concentrações diferentes. Essas soluções de diferentes concentrações foram então levadas ao espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 360 nm, a absorvância das soluções em várias concentrações foi determinada, e então a curva de calibração foi desenvolvida. As membranas com fármaco foram pesadas (0,0030 g para cada amostra) e colocadas em frasco de vidro contendo 10 mL de solução tampão de fosfato (PBS) (pH 7) e a análise foi realizada a cada 30 minutos durante quatro horas e, posteriormente, as leituras foram realizadas em 24 e 48 horas. Os experimentos foram realizados em duplicata (BARBOSA et al., 2016).

Para determinação da porcentagem de liberação do fármaco foram utilizadas as seguintes fórmulas (CHANDRASEKARAN et al., 2011):

$$\text{Concentração de fármaco} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = (\text{inclinação} \times \text{absorvância}) \pm \text{interceptação} \quad (4)$$

$$\text{Quantidade de fármaco liberada} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{concentração} \times \text{volume de dissolução banho} \times \text{fator diluição}}{1000}$$

(5)

$$\text{Porcentagem cumulativa liberada de fármaco} (\%) = \frac{\text{volume da amostra retirada (ml)}}{\text{Volume do banho (v)}} \times P(t - 1) + P_t$$

(6)

Onde: P_t é a porcentagem liberada no tempo t e $P(t - 1)$ a porcentagem liberada antes de ' t '.

5 Resultados e Discussão

5.1 Composição química do linho

A composição química das fibras de linho analisadas conforme as normas da TAPPI, com a média de seis repetições para cada padrão, esta apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Composição química do linho.

Extrativos	Lignina	Hemicelulose	α -Celulose
2,58 $\pm$ 2,11	1,70 $\pm$ 0,31	15,42 $\pm$ 0,53	63,91 $\pm$ 1

Os compostos não pertencentes à parede celular são denominados de extrativos. O teor de extrativos não excede 2% da massa de madeiras, por exemplo (SILVÉRIO et al., 2006). O valor encontrado neste trabalho é considerado elevado quando comparado ao teor de extrativos em linho reportado em outro estudo, que é de 1,7 (KHALIL et al., 2000).

O teor de lignina encontrado nas fibras de linho é considerado baixo, outros trabalhos que também utilizaram fibras de linho, encontraram valores entre 4,7 (THYGESEN et al., 2011) e 24,9 (KHALIL et al., 2000) para o teor de lignina nas fibras. Este valor baixo no teor de lignina permite um estágio de branqueamento menos agressivo para extrair a celulose com alta pureza.

O teor de hemicelulose encontrado pode ser equiparado a outros estudos com fibras de linho. Estudos reportam valores entre 12,9 (THYGESEN et al., 2011) e 13,7 (KHALIL et al., 2000). Este teor elevado de hemicelulose torna desejável a realização de um estágio alcalino na sequência de extração da celulose.

O teor de celulose encontrado é inferior a valores reportados anteriormente na literatura, 68,7 (THYGESEN et al., 2011) e 73,8 (KHALIL et al., 2000). No entanto, o

valor encontrado neste trabalho reafirma que o linho é uma fonte confiável para a extração de celulose, principalmente quando se compara ao teor de celulose encontrado em outras fontes lignocelulósicas tais como: madeira (40 a 50) (SIAU, 1995) cânhamo (69,4) e kenaf (57,6) (MORIANA et al., 2014).

5.2 Análise gravimétrica

Entre os vários métodos de obtenção de nanocristais de celulose a hidrólise ácida é a mais conhecida e amplamente utilizada. Este processo quebra as partes desordenadas e amorfas da celulose, liberando cristais bem definidos. Durante o processo de hidrólise com ácido sulfúrico, os grupos sulfato são introduzidos na superfície dos nanocristais de celulose por esterificação dos grupos hidroxila da celulose. Isso permite uma estabilização aniônica por forças repulsivas, levando à obtenção de dispersões aquosas estáveis de nanocristais de celulose. Além disso, o aumento do tempo de extração resulta em maior teor de sulfato no nanocristais de celulose (SANTOS et al., 2013). O rendimento da hidrólise de linho com ácido sulfúrico está apresentado na tabela 2.

Tabela 2. Rendimento na produção dos nanocristais de celulose variando tempo e temperatura de hidrólise em ultrassom.

Tratamento	Rendimento (%)
30 min/50°C	9,30
45 min/50°C	17,99
60 min/50°C	40,32
30 min/60°C	6,56
45 min/60°C	14,15
60 min/60°C	8,08

Valores de rendimento na produção de nanocristais de celulose, por hidrólise com ácido sulfúrico, encontrados na literatura estão entre 40 e 85%, porém esses rendimentos elevados são atribuídos ao uso de técnicas complementares tais como: micro-ondas ou sonicação posterior a hidrólise de até 5 horas (MAO et al., 2015).

5.3 Difração de Raios X

A figura 9 mostra os difratogramas de raios-X para os nanocristais de celulose obtidos após diferentes tempos e temperaturas de hidrólise. Observam-se picos em $\sim 15^\circ$, $\sim 16^\circ$, $\sim 22,5^\circ$ e $\sim 34,5^\circ$ que correspondem às difrações dos planos -110 , 110 , 200 e 004 , respectivamente. Esses valores são característicos da celulose tipo I (HARAGUCHI et al., 2013).

A posição do pico associado pelo método de Segal com a contribuição cristalina (200), assim como o ponto associado com a contribuição amorfa, estão assinalados. Enquanto a intensidade do plano (200) é semelhante em todos os casos, a atribuída à região amorfa apresenta uma diminuição constante nos tempos de reação mais longos. A Tabela 3 apresenta o índice de cristalinidade correspondente aos métodos Segal.

Tabela 3. Índice de cristalinidade.

Tratamento	Cristalinidade pelo método de Segal (%)
30min/50°C	86,2
45min/50°C	90,5
60min/50°C	91,6
30min/60°C	90,8
45min-60°C	90,9
60min/60°C	90,9

Em geral, uma alta cristalinidade pode ser observada para todos os nanocristais obtidos, com um aumento constante da cristalinidade da celulose, obtida a 50°C com o aumento no tempo de reação. Pelo método de Segal a alteração da cristalinidade para amostras tratadas a 60°C é muito baixa.

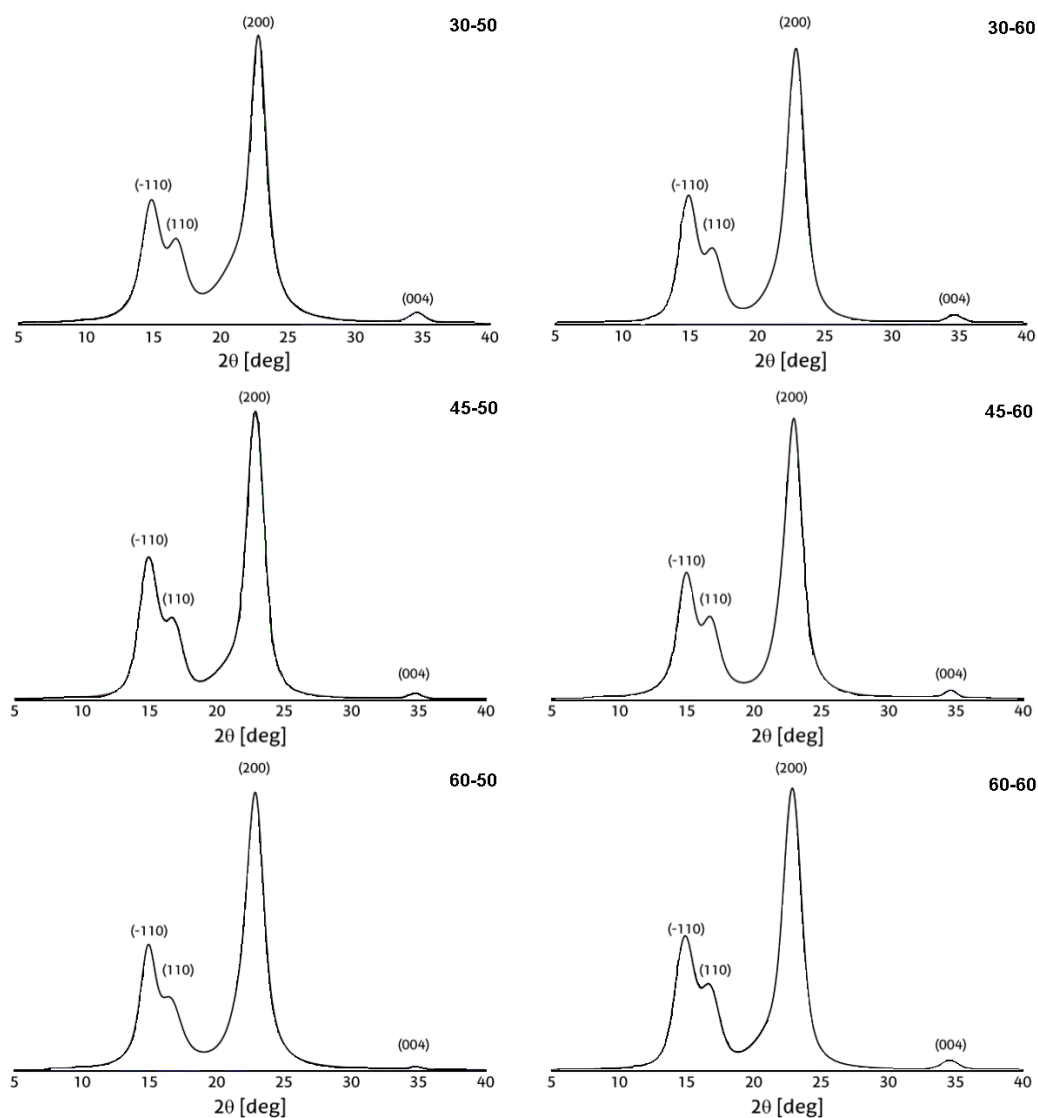


Figura 9- Difrátogramas de Raios-x da CNC obtida em diferentes tempos e temperaturas de hidrólise.

5.4 Determinação de tamanho de partícula e Potencial zeta

Na figura 10, estão apresentados os histogramas da distribuição de tamanho dos nanocristais obtidos nas diferentes condições de hidrólise. Os CNCs 60-60 apresentam a maior homogeneidade, já que quase 70% deles estão contidos na faixa de 40-50 nm. Já 30-50 e 60-50 estão dispersos mais uniformemente nas faixas de tamanho. As amostras 45-50 e 45-60 também apresentam homogeneidade em sua distribuição de tamanho, já que mais de metade das nanopartículas estão na mesma faixa, sendo 50-60 nm para 45-50

e 40-50 nm para 45-60. Essas duas amostras também apresentaram maiores rendimentos em geral, e os rendimentos do CNC mantêm uma estreita correlação, dependendo da temperatura e do tempo utilizados para a reação, sendo o tratamento de 60-60 uma exceção, pois apresenta partículas menores, mas também menor rendimento. Isso pode ser devido à degradação da cadeia de polissacarídeo de celulose em cadeias de glicose simples (Barbosa et al., 2016).

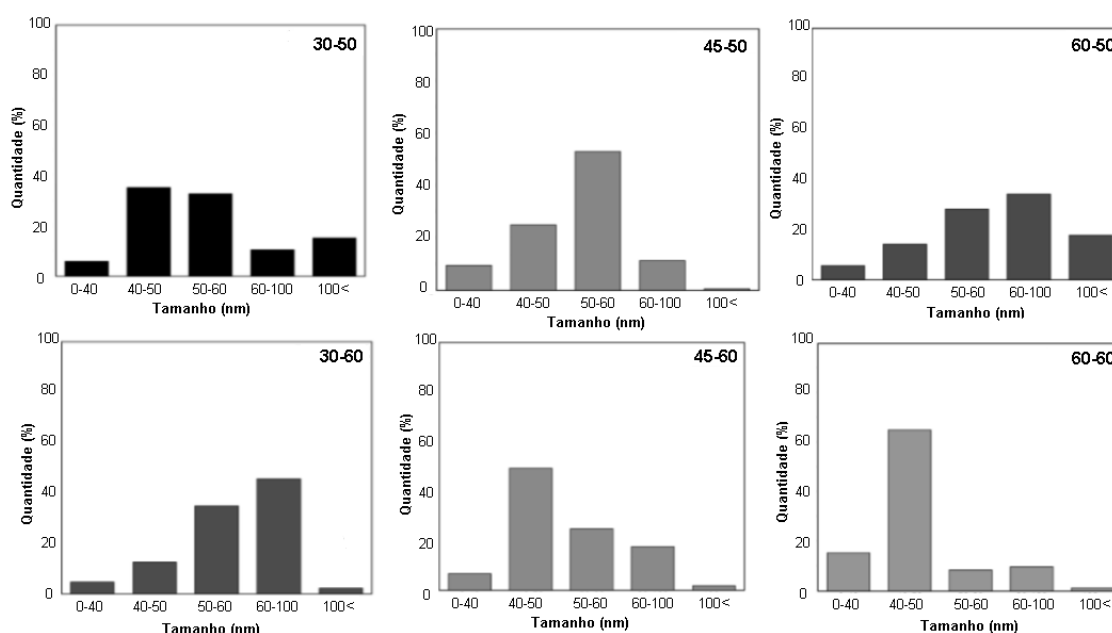


Figura 10- histogramas da distribuição de tamanho dos nanocristais obtidos mediante as diferentes condições de hidrólise.

Em relação ao potencial zeta, todos os nanocristais hidrolisados apresentaram cargas de superfície na gama característica de tais partículas. É sabido que os nanocristais de celulose preparados por hidrólise com ácido sulfúrico são carregados negativamente. A presença de grupos sulfato na superfície das partículas pode ser refletida pelo potencial zeta (LU et al.; 2014). A literatura relata o potencial zeta de -31.3 mV para nanocristais de celulose oriundos de linho obtidos por hidrólise com ácido sulfúrico (MAHMOUD et al.; 2010). Elevados valores de potencial zeta indicam boa capacidade de dispersão em água, enquanto valores baixos indicam baixa estabilidade para dispersão (LU et al.; 2014). A tabela 4 apresenta os Valores de potencial zeta obtidos neste estudo.

Tabela 4. Valores de potencial zeta dos nanocristais de celulose obtidos por diferentes condições de hidrólise.

Tratamento	Potencial zeta (mV)
30min/50°C	-32,7
45 min/50°C	-24,3
60 min/50°C	-24,3
30 min/60°C	-26,6
45 min/60°C	-25,4
60 min/60°C	-31,4

5.5 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

As fibras de linho e a celulose foram analisadas em FT-IR (figura 11). É possível observar a definição dos picos referentes a celulose, estes picos tornam-se mais pronunciados no espectro da celulose (direita). A banda entre 3600 e 3000 cm^{-1} corresponde a vibrações de alongamento de grupos hidroxila na celulose, e a banda entre 3000 e 2600 cm^{-1} corresponde aos grupos -CH. O sinal de 2920 cm^{-1} corresponde ao grupo CH_3 e o sinal de 2860 cm^{-1} corresponde ao grupo CH_2 . O pico a 1645 cm^{-1} pode ser atribuído a água absorvida em carboidratos. A banda a 1215 cm^{-1} corresponde aos grupos -OH na celulose. A banda de adsorção a 1150 cm^{-1} pode ser atribuída a ponte anti-simétrica C-O. Finalmente, o pico a 890 cm^{-1} é característico das ligações β -glicosídicas entre as unidades de glicose (BARBOSA et al., 2016).

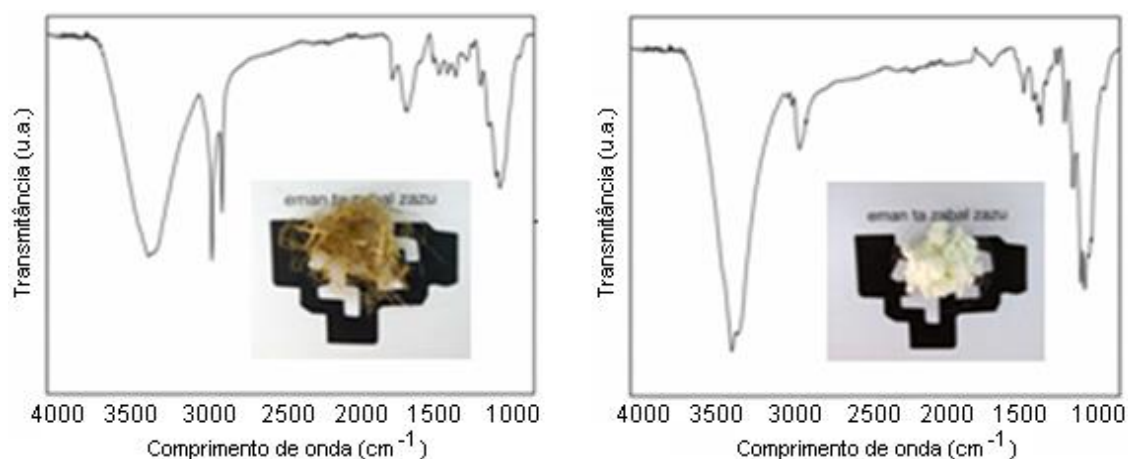


Figura 11- espectros FTIR do linho (esquerda) e da celulose (direita).

Os dados espectrais FT-IR foram utilizados para estudar mudanças nos grupos funcionais em membranas de CNC com a adição do fármaco clorexidina em diferentes concentrações (figura 12). Como as membranas são constituídas pela suspensão de CNC e a clorexidina, as bandas características da CNC e da clorexidina estão presentes no espectro mostrando a interconexão entre os componentes. Pequenas diminuições nas bandas foram observadas nas membranas CNC com clorexidina pois foram sobrepostas pelas ligações da clorexidina no mesmos comprimentos de onda. Os picos entre 1700 e 1500cm^{-1} correspondem ao anel aromático $\text{C}=\text{C}$ da CHX (PUPE et al., 2011). A banda de adsorção a 1150cm^{-1} na membrana CNC e na membrana CNC carregada com CNC pode ser atribuída ao alongamento $\text{C}-\text{O}$ de celulose e uma pequena faixa a $\sim 900\text{cm}^{-1}$ é característica de ligações glicosídicas entre unidades de glucose em celulose. (BARBOSA et al., 2016). Os espectros com CNC caracterizaram-se por uma banda de estiramento $\text{O}-\text{H}$ dominante ($\sim 3400\text{cm}^{-1}$) e uma banda elástica $\text{C}-\text{H}$ ($\sim 2900\text{cm}^{-1}$) correspondente às porções alifáticas em polissacarídeos (KALLEL et al., 2016).

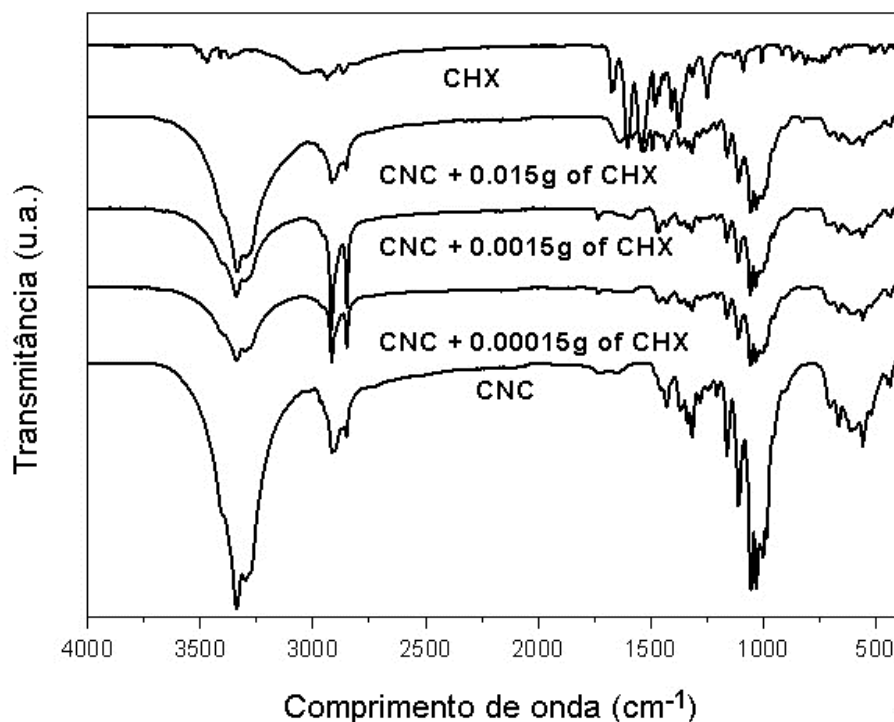


Figura 12- espectros FTIR do fármaco clorexidina, das membranas de CNC com diferentes concentrações de clorexidina e da membrana de CNC sem clorexidina.

5.6 Ressonância Magnética Nuclear

A figura 13 mostra os espectros de RMN de ^{13}C dos nanocristais de celulose após diferentes condições de hidrólise. Os sinais principais entre 110 e 55 ppm correspondem a celulose cristalina I e são atribuídos a carbonos em unidades de hidroglicose listadas de C1 a C6. Os picos no espectro de RMN referentes aos átomos de carbono na estrutura de celobiose são C1 na região de 90 a 100 ppm, C4 na região de 80 a 85 ppm, C2, C3 e C5 na região de 58 a 68 ppm e C6 na região entre 55 e 58 ppm. Pequenas variações atribuídas as diferentes condições de hidrólise podem ser observadas, tais como os prolongamentos nos picos C4 e C6 que referem-se às regiões amorfas da celulose (VANDERHART; ATALLA, 1984).

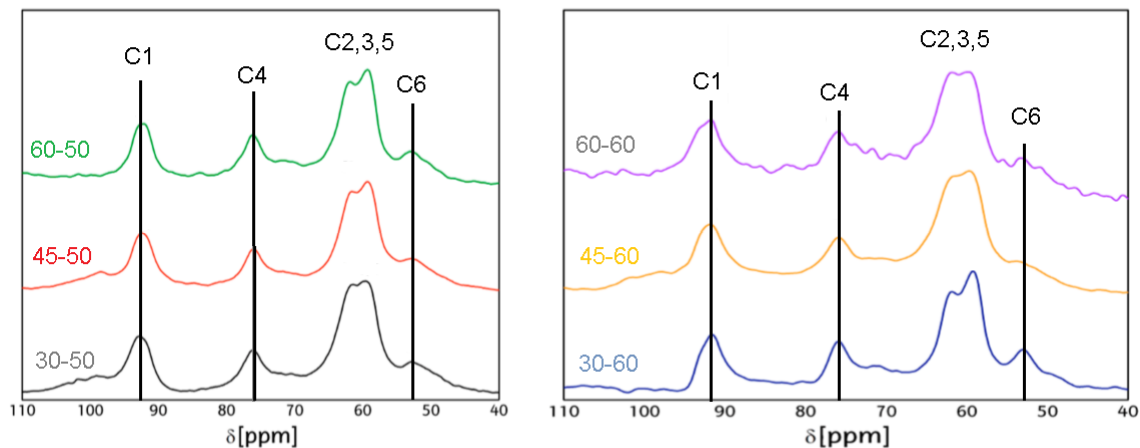


Figura 13- espectros RMN dos nanocristais de celulose após as diferentes condições de hidrólise.

A figura 14 mostra os espectros de RMN de ^{13}C da clorexidina, da membrana de nanocristais de celulose com 0,015g de clorexidina e da membrana de nanocristais de celulose sem o fármaco. A análise de RMN de estado sólido ^{13}C (CP/MAS) foi utilizada para investigar a modificação ocorrida na membrana de nanocristais de celulose com a inserção da clorexidina.

No espectro da clorexidina observam-se deslocamentos químicos atribuídos aos carbonos presentes nas guanidinas (160 ppm), nos anéis aromáticos (129 ppm) e nos alcanos ligados entre carbonos (30 ppm) e alcanos mais fortemente ligados aos nitrogênios presentes na molécula.

Os deslocamentos químicos de átomos de carbono das unidades de glucopiranoose de celulose foram atribuídos a C1 (105 ppm), C4 cristalino (89 ppm), C2,3,5 (71-75 ppm) e C6 cristalino (65 ppm) no espectro da membrana de celulose nanocristalina (LIN et al., 2016).

No espectro da membrana de nanocristais de celulose com 0,015g de clorexidina os deslocamentos atribuídos a clorexidina não são observados, observam-se apenas os deslocamentos referentes a celulose, amplificado, com uma relação semelhante de proporção entre os picos. Este fato pode ser atribuído a baixa concentração de fármaco em relação aos nanocristais celulose (10mL de nanocristais foram usados para 0,015g de clorexidina).

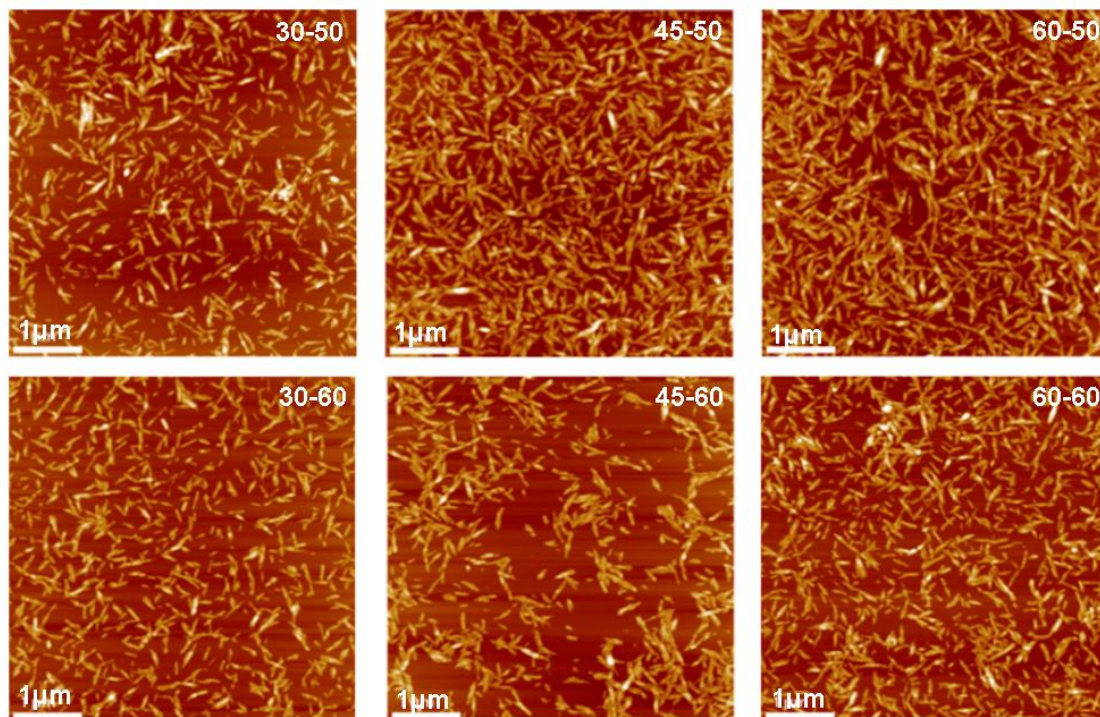


Figura 15- Imagens MFA dos nanocristais de celulose após diferentes condições de hidrólise.

Na figura 16 observam-se as imagens de MFA das membranas de celulose nanocristalina e celulose nanocristalina com três diferentes concentrações de clorexidina. As imagens em fase indicam a homogeneidade e a distribuição superficial, independentemente da rugosidade da superfície. Isso não pode ser visto a partir da imagem em altura. Nas imagens em altura observam-se variações em relação as membranas com e sem clorexidina, essas variações podem ser atribuídas a inserção das diferentes concentrações de clorexidina dissolvidas em DMSO já que os radicais de celulose são extremamente reativos e podem assim participar de reações de recombinação via reticulação (MIAO et al., 2017).

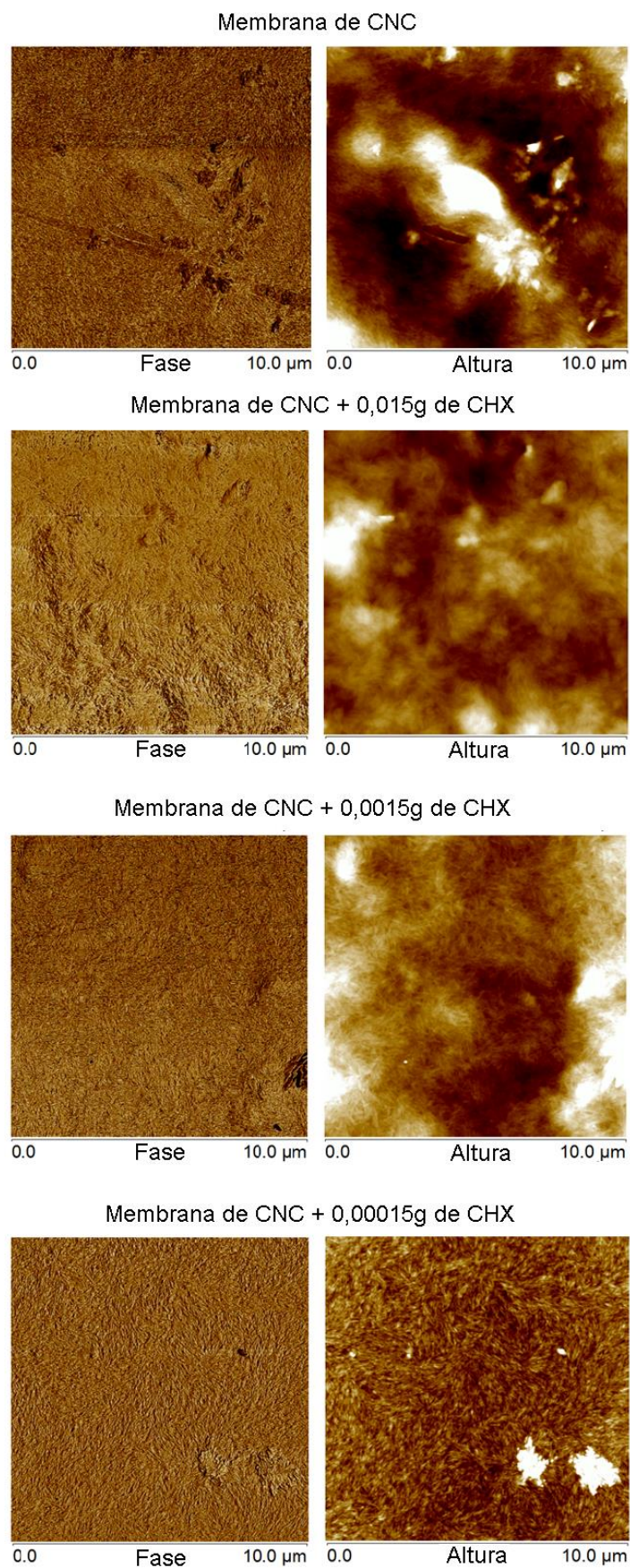


Figura 16- imagens de MFA das membranas.

A rugosidade média (RM) das membranas (tabela 5) foram obtidas pelo parâmetro do quadrado médio da raiz (STAMATIALIS: DIAS; PINHO, 2000). A maior rugosidade foi encontrada para membrana com maior concentração de clorexidina (CNC + 0,015g de CHX) e a menor rugosidade foi encontrada para membrana com menor concentração de clorexidina (membrana CNC + 0,00015g de CHX). É possível observar que a diminuição nas concentrações do fármaco clorexidina originou uma superfície mais homogênea nas membranas.

Tabela 5. Rugosidade média das membranas.

Membrana	RM*
Membrana CNC	38,75
Membrana CNC + 0,015g de CHX	44,85
Membrana CNC + 0,0015g de CHX	28
Membrana CNC + 0,00015g de CHX	5,87

*Os valores foram avaliados em uma área de 25 nm² em diferentes locais.

5.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A figura 17 mostra as microscopias MEV das membranas de nanocristais de celulose pura e com a inserção do fármaco clorexidina (0,015, 0,0015 e 0,00015g). Nessa figura, pode-se perceber a presença dos nanocristais de celulose, além da dissolução da clorexidina.

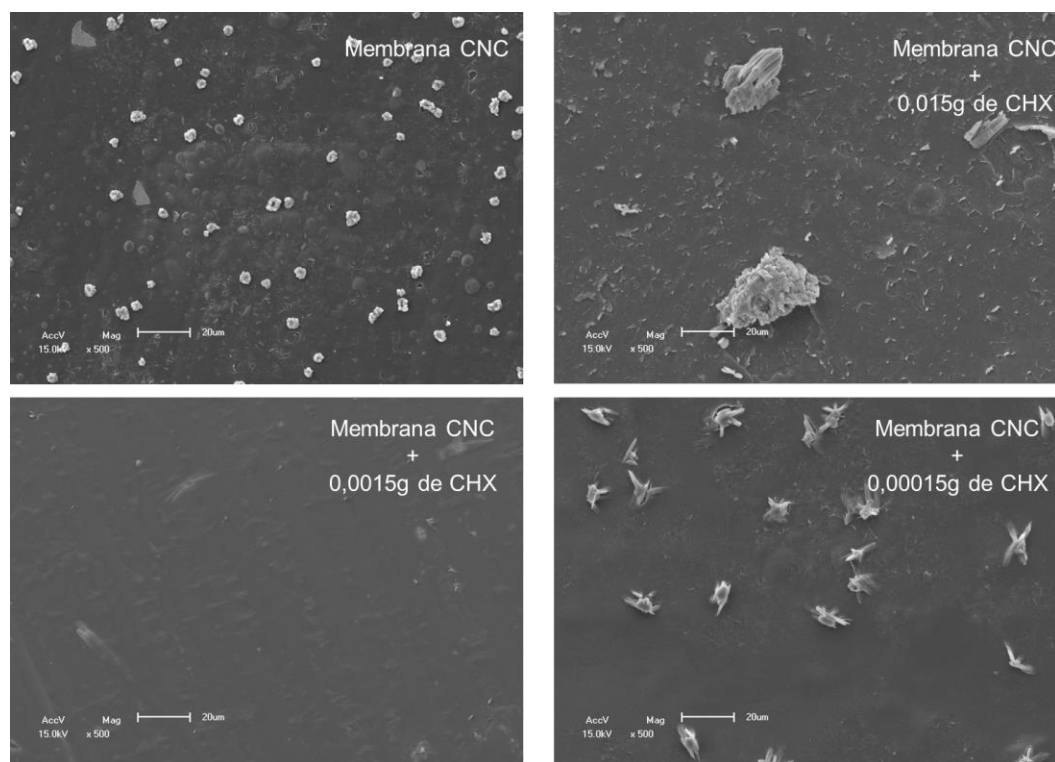


Figura 17- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das membranas de nanocristais de celulose pura e com a inserção de diferentes concentrações do fármaco clorexidina.

5.9 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da Clorexidina

A técnica de microdiluição de caldo foi escolhida para determinar a susceptibilidade do microrganismo selecionado (*S. aureus*) ao agente antimicrobiano estudado (clorexidina). Os resultados obtidos para a concentração mínima inibitória e a concentração bactericida mínima são mostrados na figura 18. Os resultados mostram os valores de CIM e CBM (ambos $31,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ para *S. aureus*). Os dados obtidos sugerem que a CHX foi eficaz contra *S. aureus* com uma concentração de $31,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Como um comportamento esperado, a susceptibilidade do microrganismo variou de acordo com as concentrações do agente antimicrobiano. A inibição contra o microrganismo foi diretamente proporcional à concentração de clorexidina, aumentando constantemente à medida que a concentração atingiu mais de $31,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

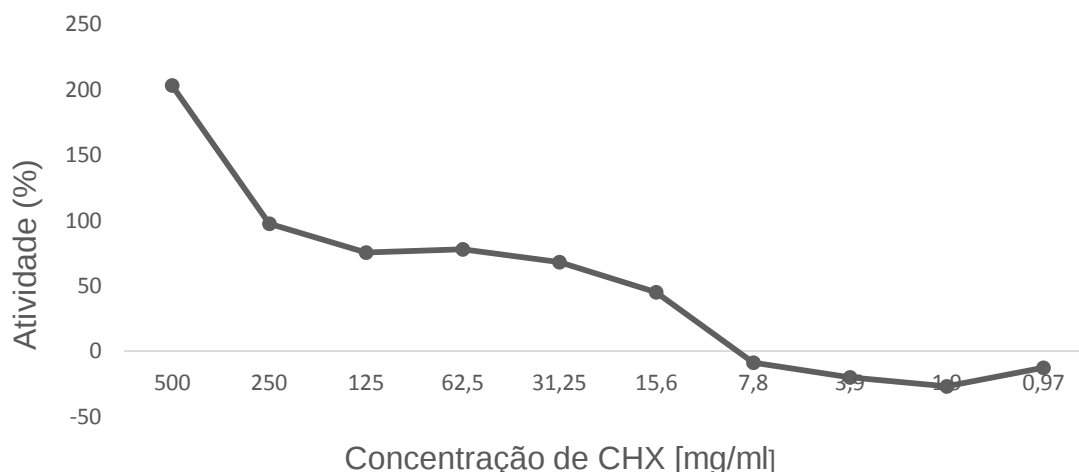


Figura 18- gráfico da atividade antibacteriana (*S. aureus*) da clorexidina.

5.10 Determinação da Atividade Antibacteriana das Membranas

A capacidade das membranas CNC-CHX para inibir o crescimento ou mesmo matar os cultivos de *S. aureus* foi avaliada pelo teste de contato direto modificado (Barbosa et al., 2016). A membrana CNC sem fármaco foi utilizada como controle, e os resultados de inibição de *S. aureus* ATCC 19095 estão apresentados na figura 19. A membrana CNC + 0,015g de CHX inibiu totalmente o crescimento bacteriano após 1h e 24h. Houve uma diminuição proporcionalmente direta na inibição do crescimento de bactérias de acordo com a diminuição da concentração de fármaco. Em altas concentrações, a CHX é bactericida através da destruição da membrana celular da bactéria. Já em concentrações mais baixas, CHX possui propriedades bacteriostáticas (ATTIN et al., 2008).

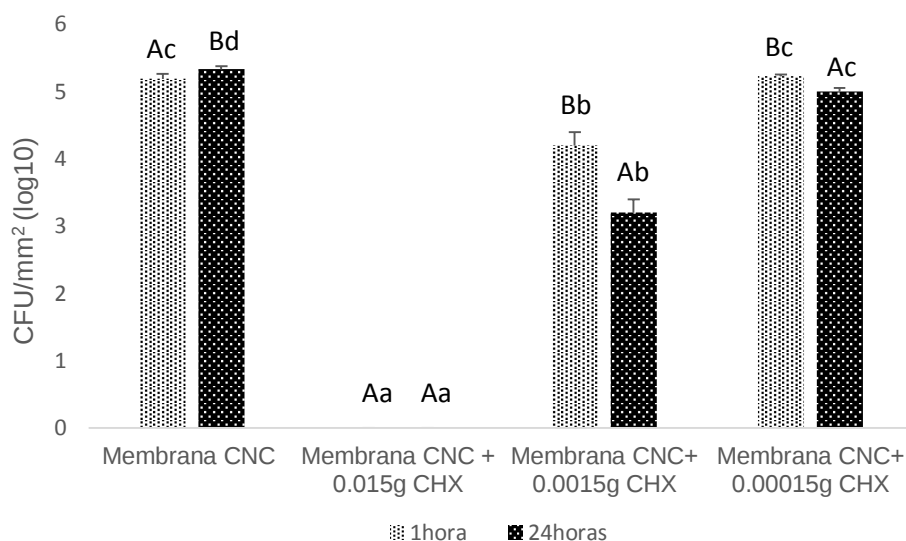


Figura 19- gráfico da sobrevivência de *S. aureus* ATCC 19095 após teste de contato direto modificado. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças estatisticamente significativas no grupo e diferentes letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,05$).

5.11 Viabilidade celular

A Figura 20 mostra a porcentagem de viabilidade celular avaliada após as 24h. O grupo não tratado foi considerado igual a 100%. O único grupo que foi estatisticamente diferente dos demais ($p < 0,05$) foi o grupo com 0,015 de CHX que apresentou 12,8 ($\pm 3,8$)% de viabilidade celular. Os outros grupos experimentais foram semelhantes ao controle e ao grupo não tratado.

A literatura relata comportamento semelhante ao encontrado neste trabalho em relação a altas concentrações de CHX, mesmo sendo um agente anti-séptico e terapêutico amplamente utilizado na medicina e odontologia, os efeitos citotóxicos da CHX são dependentes da dose (SOUZA et al., 2007; LI et al, 2014). Alguns estudos mostram que a CHX aumenta o estresse celular e pode induzir a morte celular por apoptose e necrose em culturas de fibroblastos L929 através do estresse do retículo endoplasmático (FARIA et al., 2007; 2009).

A respeito das membranas de nanocristais de celulose, há discrepância nos relatos da literatura sobre citotoxicidade (DU et al., 2015; ROMAN, 2015), mas os resultados das membranas de CNC obtidas neste trabalho, mostraram

que esse material não afeta a viabilidade celular e corrobora com estudos que indicam os CNCs como bons candidatos para aplicações nanomédicas (DONG et al., 2012).

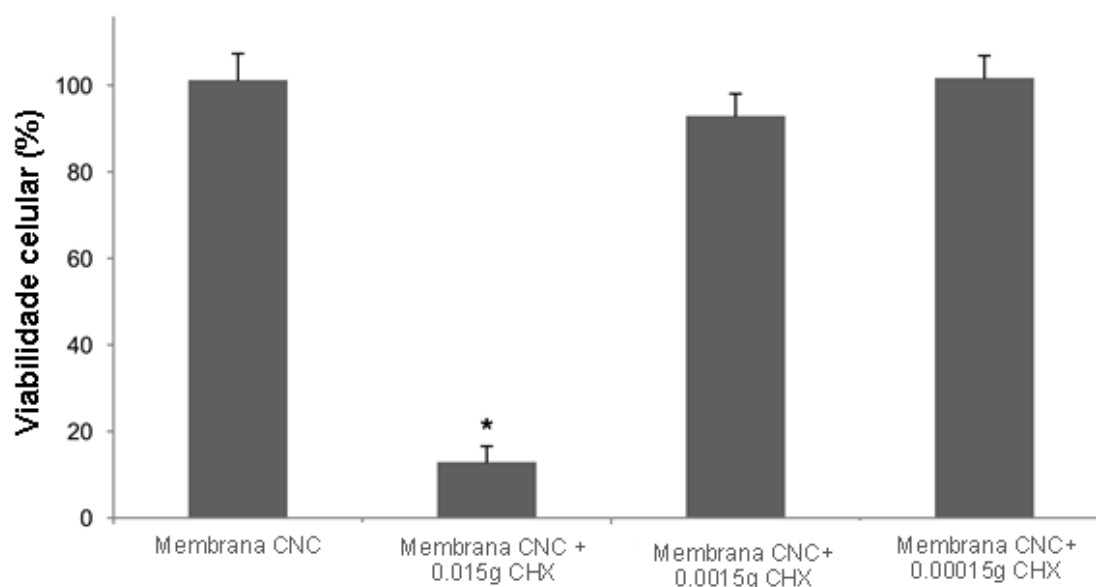


Figura 20- viabilidade celular e desvio padrão (%) para as membranas de nanocristais de celulose sem e com clorexidina (CHX) em diferentes concentrações.

*diferença estatisticamente significativa entre os outros grupos ($p < 0,05$).

5.12 Cinética de Liberação

A figura 21 apresenta o perfil de liberação cumulativa do fármaco clorexidina em função do tempo. O perfil é semelhante para as três concentrações de fármaco testadas, isto se deve ao fato da membrana de celulose nanocristalina com a adição da clorexidina ser um sistema de cinética de zero ordem, ou seja, o processo de liberação ocorre a uma taxa constante, independente da concentração de fármaco envolvida no processo, em outras palavras, a liberação não pode ser aumentada, mesmo que a concentração do fármaco seja aumentada (PUNDIR, BADOLA, SHARMA; 2017). A literatura informa que os mecanismos de adsorção da CHX em fibras celulósicas parecem ser controlados principalmente por forças eletrostáticas entre os grupos

catiônicos da CHX e os grupos sulfonados dos nanocristais de celulose, bem como a ligação de hidrogênio entre o grupo biguanidina e o p-Clorofenol da CHX com grupos hidroxila da celulose (LAVOINE et al., 2014). Os resultados demonstram que a membrana libera o fármaco antimicrobiano CHX com um desempenho satisfatório. A suspensão de CNC revela-se um veículo promissor para a liberação de fármacos, considerando que o fármaco não é inserido na superfície da membrana e sim dissolvido e inserido durante o preparo da membrana, proporcionando uma maior interação em comparação com membranas que são imersas na solução contendo fármaco já sólidas (BARBOSA et al., 2016).

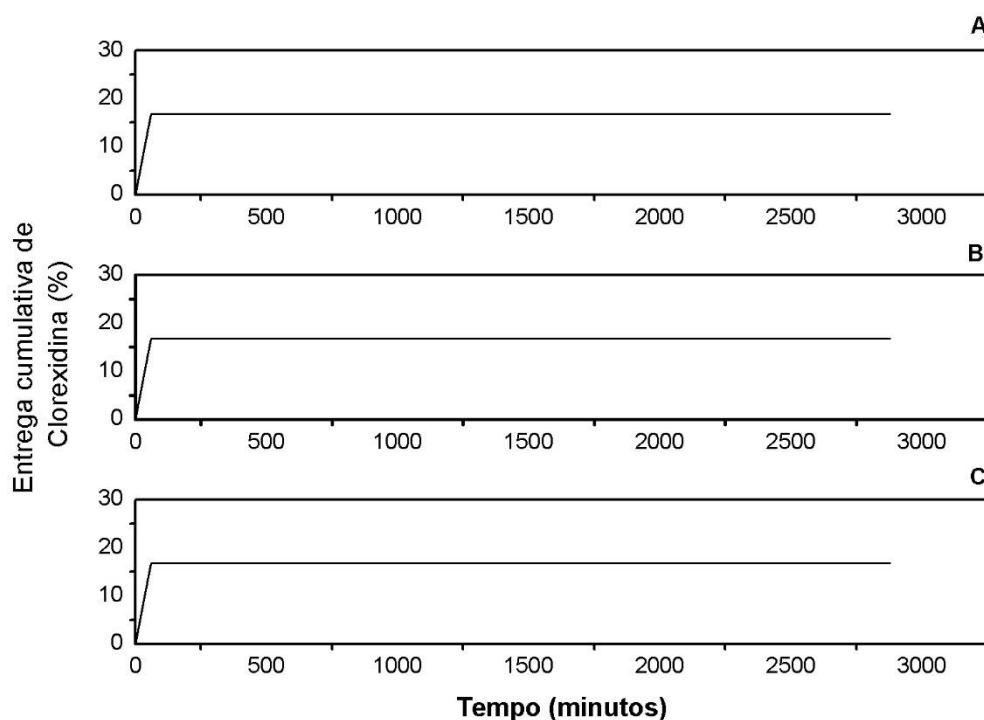


Figura 21- perfil de liberação do fármaco clorexidina: A) membrana de nanocristais de celulose + 0,015g de CHX; B) membrana de nanocristais de celulose + 0,0015g de CHX; C) membrana de nanocristais de celulose + 0,00015g de CHX.

6 Conclusões

Este trabalho visou o desenvolvimento de materiais biocompatíveis, utilizados com sistemas de liberação de fármaco, obtidos a partir de nanocelulose oriunda de fonte lignocelulósica renovável e de baixo custo.

Conclui-se que a síntese de nanocelulose a partir de linho (*Linus usitatisimum*) por meio de diferentes condições de hidrólise ácida em banho de ultrassom é viável. As variações de tempo e temperatura aplicadas no processo de hidrólise ácida em ultrassom se mostraram eficientes para obtenção dos nanocristais de celulose, ocorrendo alterações nos tamanhos de partículas obtidas e também no rendimento.

Em relação a síntese do biomaterial pela inserção do fármaco clorexidina na suspensão de nanocelulose, a metodologia empregada se mostrou simples e rápida. As técnicas de caracterização revelaram a real presença de clorexidina após a solidificação da membrana.

A avaliação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade das membranas demonstrou que elevadas concentrações de clorexidina são bacteriostáticas porém afetam a viabilidade celular, corroborando com a literatura. Concentrações menores de clorexidina apresentaram comportamento bacteriostático mais eficientes em 24 horas e os resultados de viabilidade celular para estas concentrações foram satisfatórios.

O perfil de liberação do fármaco foi avaliado e os resultados demonstram que a membrana liberou o fármaco antimicrobiano CHX de maneira gradual e contínua durante o período de tempo avaliado, sendo este um desempenho considerado satisfatório.

A utilização de biocompósitos se mostra particularmente interessante no campo da liberação de fármacos devido sua obtenção ser simples, a qual poderá representar uma contribuição expressiva aos procedimentos tradicionalmente adotados.

7 Cronograma

Na tabela 6 está apresentado o cronograma de atividades desenvolvido durante o período do doutorado, com duração de 43 meses.

Tabela 6. Cronograma de atividades desenvolvidas durante o período de doutorado.

Atividade	Período (meses)					
	1 - 6	7 - 12	13 - 18	19 - 24	25 - 30	31 - 43
Revisão bibliográfica						
Disciplinas*						
Qualificação						
Doutorado Sanduíche na UPV						
Síntese da nanocelulose						
Síntese das membranas						
Caracterização dos materiais						
Avaliação das membranas como Sistema de entrega de Fármaco						
Participação em Evento Internacional						
Publicação de Artigos Científicos						
Produção da Tese						
Defesa da Tese						

*Pedido de reaproveitamento das disciplinas já cursadas no programa durante o Mestrado.

8 Colaborações e Suporte Financeiro

Para execução deste trabalho, a colaboração com diferentes departamentos e instituições foi fundamental e necessária para se alcançar a os objetivos. Durante o período de doutoramento foi feito uso das relações dos grupos de pesquisa que colaboram com o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.

É importante ressaltar que durante o período de doutorado, a interação com o grupo de pesquisa, formado por outros alunos de doutorado, mestrado e iniciação científica, foi de extrema importancia a fim de transmitir conhecimento e dar suporte a esta e a outras pesquisas.

A aluna participou do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da Capes. A bolsa PDSE foi concedida para o período de 12 meses nos quais a bolsista desenvolveu a pesquisa na Universidade do País Basco (UPV/EHU) na Espanha além de participar de eventos como palestras e congressos.

Este trabalho conta com o suporte financeiro em vigor de projetos oriundos de Editais aprovados pela equipe da UFPel (Pesquisador Gaúcho Faixa B 2013 /FAPERGS), além de bolsa Capes e PDSE-Capes concedida a doutoranda.

Referências

ASKELAND, D. R.; PHULÉ, P. P. **Ciência e engenharia dos materiais**. São Paulo: Cengage Learning, 2008. 594p.

ATTIN, T.; ABOUASSI, T.; BECKER, K.; WIEGAND, A.; ROOS, M.; ATTIN, R. A new method for chlorhexidine (CHX) determination: CHX release after application of differently concentrated CHX-containing preparations on artificial fissures. **Clin. Oral Investig.**, v.12, p.89–196, 2008.

BARBOSA, A.M; ROBLES, E.; RIBEIRO, J.S.; LUND, R.G.; CARREÑO, N.L.V.; LABIDI, J. Cellulose nanocrystal membranes as excipients for drug delivery systems. **Materials**, v.9, n. 12, p.1-15, 2016.

BÁRTOLO, P.; BIDANDA, B. **Biomaterials and Prototyping Applications in Medicine**. New York: Springer, 2008. 216p.

BLACKBURN, R.S.; HARVEY, A.; KETTLE, L.L.; MANIAN, A.P.; PAYNE, J.D.; RUSSELL, S. J. Sorption of Chlorhexidine on Cellulose: Mechanism of Binding and Molecular Recognition. **J. Phys. Chem. B**, v.111, p.8775-8784, 2007.

BONFIELD, W.: **European white book on fundamental research in materials science**. Max-Planck – Institut Für Metallforschung. Cap. 2. Stuttgart, 2002. p. 72.

BRINCHI, L.; COTANA, F.; FORTUNATI, E.; KENNY, J.M. Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: Technology and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 154 – 169, 2013.

CALLISTER, JR; M. D. **Ciência e engenharia de materiais**: uma introdução. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 705p.

CARREÑO, N.L.V.; BARBOSA, A.M.; NOREMBERG, B.S.; SALAS, M.M.S.; FERNANDES, S.C.M.; LABIDI, J. **Advances in Nanostructured Cellulose-based Biomaterials**. Springer International Publishing, 2017. 37p.

CHASIN, M.; LANGER, R. **Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems**. New York: Marcel Dekker INC., 1990. 347p.

CHANDRASEKARAN, A. R.; JIA, C.Y.; THENG, C.S.; MUNIANDY, T.; MURALIDHARAN, S.; DHANARAJ S. A. In vitro studies and evaluation of metformin marketed tablets-Malaysia. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.1, n.5, p. 214-217, 2011.

CHAWLA, K. K. **Composite Materials**: Science and Engineering. 3ed. New York: Springer, 2011. 542p.

CHEN, L.; BROMBERG, L.; HATTON, T.A.; RUTLEDGE, G.C. Electrospun cellulose acetate fibers containing chlorhexidine as a bactericide. **Polymer**, v. 49, p. 1266–1275, 2008.

CHEN, L.; RENDE, D.; SCHADLERB, L. S.; OZISIKB, R. Polymer nanocomposite foams. **Journal of Materials Chemistry A**, v.1, p. 3837 – 3850, 2013.

CHEN, Y.; LUI, C.; CHANG, P. R.; CAO, X.; ANDERSON, D. P. Bionanocomposite based on pea starch and cellulose nanowhiskers hydrolyzed from pea hull fibre: effect of hydrolysis time. **Carbohydrate Polymers**, v. 8, p. 113 - 118, 2009.

COSTA, M. M.; QUEIROZ, P. R. M. Bioengineering of epithelial and cartilaginous tissue. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 11, n. 2, p. 107-119, 2013.

DOMINGUES, R. M.A.; GOMES, M.E.; REIS R.L. The potential of Cellulose Nanocrystals in Tissue Engineering strategies. **Biomacromolecules**, v.15, n.7, p. 2327–2346, 2014.

DONG, S.; HIRANI, A.A.; COLACINO, K.R.; LEE, Y.W.; ROMAN, M. Cytotoxicity And Cellular Uptake Of Cellulose Nanocrystals. **Nano Life**, v. 2, n.3, p.1-12, 2012.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hidrogels for tissue engineering scaffold desing variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, p. 4337 – 4351, 2003.

DU, L.; ARNHOLT, K.; RIPP, S.; SAYLER, G.; WANG, S.; LIANG, C.; WANG, J.; ZHUANG, J. Biological toxicity of cellulose nanocrystals (CNCs) against the luxCDABE-based bioluminescent bioreporter *Escherichia coli* 652T7. **Ecotoxicology**, v.24, n.10, p.2049-2053, 2015.

DUFRESNE, A. Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial. **Materials Today**, v.16, n.6, p. 220-227, 2013.

FAN, L.; GHARPURAY, M.M.; LEE Y.H. **Cellulose Hydrolysis** Berlin: Springer, 1987. 198p.

FARIA, G.; CELES, M.R.; ROSSI, A.; SILVA, L.A.; SILVA, J.S.; ROSSI, M.A. Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured L929 fibroblasts. **J. Endod.** v.33, p.715 –722, 2007.

FARIA, G.; CARDOSO, C.R.B; LARSON R.E. A.; SILVA, J.S.; ROSSI, M.A. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: A role forendoplasmic reticulum stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 234, p. 256 – 265,2009.

FARINA, M. Z.; SOARES, T. E.; CHILOMER, S. K.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K. Análise da aplicação de resíduos do corte de palmito pupunha (*Bactrisgasipaes*H.B.K.) em compósitos de matriz poliéster com diferentes proporções. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7, n. 2, p. 131-138, 2012.

FELÍCIO, R.; ALBUQUERQUE, S.; YOUNG, M.C.M.; YOKOYA, N.S.; DEBONSI, H.M. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **J.Pharm. Biomed. Anal.**, v.52, p.763–769, 2008.

FERNANDES, J.G.; CORREIA, D.M.; BOTELHO, G.; PADRÃO, J.; DOURADO, F.; RIBEIRO, C.; LANCEROS-MÉNDEZ, S.; SENCADAS, V. PHB-PEO electrospun fiber membranes containing chlorhexidine for drug delivery applications. **Polymer Testing**, v.34, p.64-71, 2014.

GOMES, L. S. M. Biomateriais em Artroplastia de Quadril: Propriedades, Estrutura e Composição. In: **O Quadril**. 1.ed. São Paulo: Atheneu, 2010, p. 121-143.

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. Cellulose nanocrystals: Chemistry, selfassembly, and applications. **Chemical Reviews**, v. 110, p. 3479–3500, 2010.

HARAGUCHI, S. K.; SILVA, A. A.; TENÓRIO-NETO, E. T.; CARVALHO, G. M.; MUNIZ, E.C.; RUBIRA, A.F. Glycerol - derived polyurethane nanocomposites containing cellulose nanowhiskers. **Acta Sci. Technol.**, v.35, n.4, p. 747–755, 2013.

HE, J.; SHIZHONG, C.; WANG, S. Preparation and crystalline analysis of high-grade bamboo dissolving pulp for cellulose acetate. **J. Appl. Polym. Sci.**, v.107, p.1029–1038, 2008.

HENCH, L.L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, v. 19, p. 1419-1423, 1998.

HENNESSEY, T.D. Some antibacterial properties of chlorhexidine. **Journal of Periodontal Research**, v. 8, p.61–67, 1973.

HILLERY, A. M.; LLOYD, A. W.; SWARBRICK, J. **Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists**. New York: Taylor & Francis Inc, 2005. 431p.

IOELOVICH M. Study of cellulose interaction with concentrated solutions of sulfuric acid. **ISRN Chemical Engineering**, v. 2012, p.1-7, 2012.

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

KALLEL, F.; BETTAIE, F.; KHIARI, R.; GARCÍA, A.; BRAS, J.; CHAABOUNI, S.E. Isolation and structural characterization of cellulose nanocrystals extracted from garlic straw residues. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p.287–296, 2016.

KHALIL, H.P.S.; ROZMAN, H.D.; AHMAD, M.N.; ISMAIL, H. Acetylated Plant-Fiberreinforced Polyester Composites: A Study of Mechanical, Hygrothermal, and Aging Characteristics. **Polym.-Plast. Technol.**, v.39, p.757–781, 2000.

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

LACERDA, P. S. S.; BARROS-TIMMONS, A. M. M. V.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Nanostructured Composites Obtained by ATRP Sleeving of Bacterial Cellulose Nanofibers with Acrylate Polymers. **Biomacromolecules**, v. 14, p. 2063-2073, 2013.

LAVOINE, N.; DESLOGES, I.; SILLARD, C.; BRAS, J. Controlled release and long-term antibacterial activity of chlorhexidine digluconate through the nanoporous network of microfibrillated cellulose. **Cellulose**, v.21, p.4429–4442, 2014.

LI, Y.; KUAN, Y.; LEE, T.; HUANG, F.; CHANG, Y. Assessment of the cytotoxicity of chlorhexidine by employing an in vitro mammalian test system. **J Dent Sci.**, v.9, n.2, p.130–135, 2014.

LIMA, M. M. S.; BORSALI, R. Static and Dynamic Light Scattering from Polyelectrolyte Microcrystal Cellulose. **Langmuir**, v.18, p. 992, 2002.

LIMA, M. M. S.; WONG, J. T.; PAILLET, M.; BORSALI, R.; PECORA, R. Translational and Rotational Dynamics of Rodlike Cellulose Whiskers. **Langmuir**, v. 19, 2003.

LIN, N.; GÈZE, A.; WOUESSIDJEW, D.; HUANG, J.; DUFRESNE, A. Biocompatible Double-Membrane Hydrogels from Cationic Cellulose Nanocrystals and Anionic Alginate as Complexing Drugs Co-Delivery. **ACS Appl. Mater. Interfaces.**, v. 8, n. 11, p. 6880–6889, 2016.

LIN, W. C.; LIEN, C. C.; YEH, H. J.; YU, C. M.; HSU, S. H. Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 603 – 611, 2013.

LU, A.; HEMRAZ, U.; KHALIL, I. Z.; BOLUK, Y. Unique viscoelastic behaviors of colloidal nanocrystalline cellulose aqueous suspensions. **Cellulose**, v. 21, n.3, p.1239–1250, 2014.

LUO, X.; WEAVER, C. L.; TAND, S.; CUI, X. T. Pure graphene oxide doped conducting polymer nanocomposite for bio-interfacing. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, p. 1340 – 1348, 2013.

MAHMOUD, K.A.; MENA, J.A.; MALE, K.B.; HRAPOVIC, S.; KAMEN, A.; LUONG, J.H.T. Effect of surface charge on the cellular uptake and cytotoxicity of fluorescent labeled cellulose nanocrystals. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 2, p. 2924–2932, 2010.

MAO, J.; HECK, B.; REITER, G.; LABORIE, M.P. Cellulose nanocrystals production in near theoretical yields by 1-butyl-3-methylimidazolium hydrogen sulfate ([Bmim]HSO₄) – mediated hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v.117, p. 443–451, 2015.

MEDLICOTT, N.J.; TUCKER, I.G.; RATHBONE, M.J.; HOLBOROW, D.W.; JONES, D.S. Chlorhexidine release from poly(ε-caprolactone) films prepared by solvent evaporation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.143, p. 25-35, 1996.

MENG, N.; ZHOU, N.L.; ZHANG, S.Q.; SHEN, J. Controlled release and antibacterial activity chlorhexidine acetate (CA) intercalated in montmorillonite. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382, p. 45– 49, 2009.

MIAO, J.; YU, Y.; JIANG, Z.; TANG, L.; ZHANG, L. Partial delignification of wood and membrane preparation using a quaternary ammonium ionic liquid. **Scientific reports**, v. 7, p.1-12, 2017.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; FILHO, M. M. S.; NASCIMENTO, L. D.; NASCIMENTO, D. M.; CASSALES, A. R. Extraction and characterization of

nanocellulose structures from raw cotton linter. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 229 – 235, 2013.

MORIANA, R.; VILAPANA, F.; KARLSSON, S.; RIBES, A. Correlation of chemical, structural and thermal properties of natural fibres for their sustainable exploitation. **Carbohydr. Polym.**, v.112, p.422–431, 2014.

MOSHREFI, A. Chlorhexidine. **The Journal of the Western Society of Periodontology/Periodontal Abstracts**, v. 50, n. 1, p.5-9, 2002.

NICHOLSON, J. W. **The chemistry of medical and dental materials**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002. 242 p.

NYSTROM, G.; MIHRANYAN, A.; RAZAQ, A.; LINDSTROM, T.; NYHOLM, L.; STROMME, M. A Nanocellulose Polypyrrole Composite Based on Microfibrillated Cellulose from Wood. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 4178–4182, 2010.

OKAMOTO, M.; JOHN, B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1487– 1503, 2013.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; COFFMAN, S. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p.1094–1097, 1995.

PUNDIR, S ; BADOLA, A; SHARMA, D. SUSTAINED RELEASE MATRIX TECHNOLOGY AND RECENT ADVANCE IN MATRIX DRUG DELIVERY SYSTEM: A REVIEW. **International Journal of Drug Research and Technology**, v. 3, n. 1, p. 8, 2017.

PUPE, C.G.; VILLARDI, M.; RODRIGUES, C.R.; ROCHA, H.V.A.; MAIA, L.C.; SOUSA, V.P.; CABRAL, L.M. Preparation and evaluation of antimicrobial activity of nanosystems for the control of oral pathogens *Streptococcus mutans* and

Candida albicans. **International Journal of Nanomedicine**, v.6, p.2581–2590, 2011.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E.

Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. San Diego: Academic Press, 2003. 484p.

ROBLES, E.; URRUZOLA, I.; LABIDI, J.; SERRANO, L. Surface modified nanocellulose as reinforcement in poly(lactic acid) to conform new composites. **Ind. Crops Prod.**, v.71, p.44–53, 2015.

ROMAN, M. Toxicity of Cellulose Nanocrystals: A Review. **Industrial Biotechnology**, v.11, n.1, p.25-33, 2015.

ROMAN, M.; DONG, S. P.; ANJALI, H.; LEE, Y. W. In: Polysaccharide materials: Performance by design. **Cellulose nanocrystals for drug delivery**. Washington DC: American Chemical Society, 2010. p. 81–91.

ROMAN, M.; WINTER, W. T. Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose. **Biomacromolecules**, v.5, n. 5, p. 1671–1677, 2004.

SAITO, T.; OAKI, Y.; NISHIMURA, T.; ISOGAI, A.; KATO, T. Bioinspired stiff and flexible composites of nanocellulose-reinforced amorphous CaCO₃. **Materials Horizons**, v.1, p. 1-5, 2014.

SANTOS, R.M.; NETO, W.P.F.; SILVÉRIO, H.A.; MARTINS, D.F.; DANTAS, N.O.; PASQUINI, D. Cellulose nanocrystals from pineapple leaf. A new approach for the reuse of this agro-waste. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 707–714, 2013.

SEGAL, L.; CREELY, J.J.; MARTIN, A.E., JR.; CONRAD, C.M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Text. Res. J.**, v.29, p. 786–794, 1959.

SCAFFARO, R.; BOTTA, L.; SAN FILIPPO, M.; GALLO, G.; PALAZZOLO, G.; PUGLIA, A.M. Combining in the melt physical and biological properties of poly(-

caprolactone) and chlorhexidine to obtain antimicrobial surgical monofilaments.

Applied Microbiology and Biotechnology, v. 97, p. 99–109, 2013.

SCHAFFAZICK, R. S.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S.

Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. **Acta Farmacéutica**

Bonaerense, v. 21, n.2, p. 99-106, 2002.

SIAU, J.F. **Wood: influence of moisture on physical properties**. Vir ginia:

Department of Wood Science and Forest Products, Virginia Polytechnic Institut and State University, 1995. 227 p.

SILVÉRIO, F.O.; BARBOSA, L.C.A; GOMIDE, J.L.; REIS, F.P.; PILÓ-VELOSO,

D. Metodologia de extração e determinação do teor de extrativos em madeiras de eucalipto. **R. Árvore**, v.30, n.6, p.1009-1016, 2006

SMOLUCHOWSKI, M. Contribution to the theory of electro-osmosis and related phenomena. **Bull. Int. Acad. Sci. Crac.**, v3, p.184–199, 1903.

SOUZA, L. M. M.; BORSALI, R. Rodlike Cellulose Microcrystals: Structure,

Properties, and Applications. **Macromol. Rapid Commun**, v. 25, p. 771-787, 2004.

SOUZA, L.B.; AQUINO, S.G.; SOUZA, P.P.; HEBLING, J.; COSTA, C.A.

Cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine. **Am J Dent.**, v.20, n.6, p.400-404, 2007.

SOUZA, S. F.; CHERIAN, B. M.; LEÃO, A. L.; TELASCREA, M.; CHAVES, M. R.

M. NARINE, S. S.; SAIN, M. Potential biomedical applications of renewable nanocellulose. In: Green composites from natural resources. New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. p. 282-301.

STAMATIALIS, D.F.; DIAS, C.R.; PINHO, M. N. Structure and Permeation Properties of Cellulose Esters Asymmetric Membranes. **Biomacromolecules**,

v.1, p.564-570, 2000.

THAKUR, V. K. **Nanocellulose Polymer Nanocomposites**. New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2014. 513p.

THYGESEN, A.; MADSEN, B.; BJERRE, A.B.; LILHOLT, H. Cellulosic Fibers: Effect of Processing on Fiber Bundle Strength. **J. Nat. Fibers**, v.8, p.161–175, 2011.

TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. Química Analítica de Processos. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1065-1071, 2006.

TECHNICAL ASSOCIATION OF PULP AND PAPER INDUSTRY. **Acid – insoluble lignin in wood and pulp**. T222 om-98. TAPPI test methods. Atlanta: TAPPI Press. 1998.

TECHNICAL ASSOCIATION OF PULP AND PAPER INDUSTRY. **Alpha-, beta- and gamma-cellulose in pulp**. T 203 om-93 TAPPI test methods. Atlanta: TAPPI Press. 1993.

TECHNICAL ASSOCIATION OF PULP AND PAPER INDUSTRY. **Pentosans in wood and pulp**. T 223 cm-84. TAPPI test methods. Atlanta: TAPPI Press. 1984

TECHNICAL ASSOCIATION OF PULP AND PAPER INDUSTRY. **Solvents extractives of wood and pulp**. T 204 cm-97. TAPPI test methods. Atlanta: TAPPI Press. 1997.

VALLET-REGI M. Introduction to the world of biomaterials, **Anales de Química International Edition**, v. 93, p. S6 – S1, 1997.

VANDERHART, D. L.; ATALLA, R. H. Studies of microstructure in native celluloses using solid - state carbon - 13 NMR. **Macromolecules**, v.17, n.8, p. 1465-1472, 1984.

VERRAEDT, E.; PENDELA, M.; ADAMS, E.; HOOGMARTENS, J.; MARTENS, J.A. Controlled release of chlorhexidine from amorphous microporous silica. **Journal of Controlled Release**, v.142, p. 47–52, 2010.

ZHANG, H.; SHEN, Y.; RUSE, N.D.; HAAPASALO, M. Antibacterial Activity of Endodontic Sealers by Modified Direct Contact Test against *Enterococcus Faecalis*. **J. Endod.**, v.35, p.1051–1055, 2009.

WANG, B.; SIAHAAN, T.; SOLTERO, R. **Drug Delivery**: Principles and Applications. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2005. 464p.

WILLIAMS D.F. Definitions in Biomaterials. In: **Progress in Biomedical Engineering** - Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials. Amsterdam: Elsevier, 1987. V. 4, Cap. 6, p. 49-59.

WILLIAMS D.F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, p.2941–2953, 2008.

Apêndices

Apêndice A – Artigo: Cellulose nanocrystals membrane loaded with 5-(4-Methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carboximidamide for drug delivery. A ser submetido para publicação.

Apêndice B- Artigo: Cellulose Nanocrystal Membranes as Excipients for Drug Delivery Systems. Revista: Materials, 2016.

Apêndice C- Production of cellulose nanoentities from blue agave waste treated with environmentally friendly processes. Submetido para revista Carbohydrate Polymers.

Apêndice D- Livro: Advances in Nanostructured Cellulose-based Biomaterials. Publicado por: Springer International Publishing, 2017.

**Apêndice E- Artigo: Nano and Micro Ceramic Membranes from Degradable
Templates. Revista: Materials Research, 2016.**

**Apêndice F- Artigo: Metal-carbon Interactions on Reduced Graphene
Oxide under Facile Thermal Treatment: Microbiological and Cell Assay.**

Revista: Journal of nanomaterials, 2017.