

Francisca Rocha Melo Fonseca

## IMPRESSÃO 3D DE NANOCOMPÓSITOS: AS BACTÉRIAS COMO FORNECEDORAS DE MATÉRIA-PRIMA

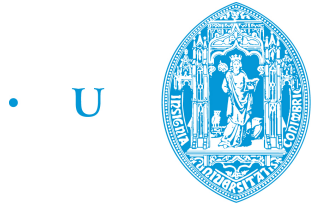
Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica, especialidade em Biomateriais e Instrumentação Médica,  
orientada pela Professora Doutora Ana Paula Piedade e Doutor Romeu Francisco,  
apresentada no Departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra.

Julho 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA





• C •

FCTUC

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
E TECNOLOGIA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Francisca Rocha Melo Fonseca

# **Impressão 3D de nanocompósitos: as bactérias como fornecedoras de matéria-prima**

Dissertação submetida à  
Universidade de Coimbra para obtenção do grau de  
Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Professora Doutora Ana Paula da Fonseca Piedade  
Doutor Romeu Miranda Francisco

**Coimbra, 2017**





Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com:

Centro de Engenharia Mecânica  
Materiais e Processos

**CEMMPRE**

Centre for Mechanical Engineering  
Materials and Processes  
. UC | UP | UTAD .



Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.



*"Enfim duma escolha faz-se um desafio  
Enfrenta-se a vida de fio a pavio  
Navega-se sem mar, sem vela ou navio  
Bebe-se a coragem até dum copo vazio  
E vem-nos à memória um frase batida  
Hoje é o primeiro dia do resto da tua vida"*

Sérgio Godinho





# Agradecimentos

Durante este longo percurso e nem sempre fácil da elaboração da dissertação de mestrado, importa destacar aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o seu desenvolvimento.

Gostaria, em primeiro lugar, de agradecer à Professora Doutora Ana Paula Piedade pela orientação, dedicação e disponibilidade e, por durante um estágio de verão, me ter inculcido o gosto pela área dos biomateriais.

Ao Doutor Romeu Francisco pelo acompanhamento e ajuda durante a execução do trabalho experimental e, sobretudo, pela paciência.

À Doutora Ana Clotilde pela constante disponibilidade para responder às minhas dúvidas e me ter ajudado sempre que precisei.

Ao Professor Doutor Artur Mateus, à Mestre Tânia Viana e à Mestre Sara Biscaia, pela impressão tridimensional, no CDRsp.

Ao Professor Doutor Pedro Antunes, à Professora Doutora Paula Amaro e ao Professor Doutor Fernando Nogueira pela disponibilidade e atenção.

Ao grupo de Microbiologia e do CEMMPRE pela simpatia.

À empresa Perstorp pela cedência dos polímeros sintéticos.

Aos meus amigos de Coimbra, de Erasmus e colegas de casa que tornaram o meu percurso académico mais rico e inesquecível.

Aos meus amigos de sempre pelo apoio, amizade e confiança.

À família Orvalho, de Coimbra, que sempre me ajudou e alegrou.

À minha família, em especial aos meus pais e irmã, por todo o incentivo, carinho e por me terem concedido todas as oportunidades para a minha formação.

A todos, e do fundo do meu coração, um muito obrigada!



# Resumo

Os biomateriais utilizados em engenharia de tecidos são, normalmente, poliméricos. Dada a procura, cada vez maior, de materiais biodegradáveis, sobretudo de origem natural, os biopolímeros produzidos pelas bactérias são, de acordo com a literatura, adequados para aplicações biomédicas. Para além de propriedades como a biocompatibilidade, os *scaffolds* requerem um desempenho termomecânico superior aos polímeros biodegradáveis. Em resposta a este desafio, são produzidos compósitos de matriz polimérica reforçados com fibras naturais.

Neste estudo foi avaliado o biopolímero produzido pela bactéria *Phyllobacterium myrsinacearum*, nunca referido na literatura científica ou em patentes. A caracterização revelou que a celulose bacteriana (CB) é, contrariamente a toda a celulose produzida por bactérias referida na literatura, hidrófoba. O biopolímero é constituído por fibrilas de comprimento micrométrico e com diâmetro nanométrico que apresenta uma estrutura semicristalina. Apresenta também propriedades mecânicas superiores às reportadas na literatura, nomeadamente no que diz respeito ao seu módulo de elasticidade e dureza.

Os nanocompósitos de poli( $\epsilon$ -caprolactona) reforçados com CB foram produzidos por modificação *ex situ* e impressos tridimensionalmente por processo aditivo (3D). Tanto os homopolímeros de PCL (PCL 6800 e PCL 8502A) como os compósitos (PCL 6800/CB e PCL 8502A/CB) foram caracterizados quanto à sua cristalinidade, estrutura química, comportamento térmico e molhabilidade. As propriedades mecânicas foram avaliadas por ensaios de tração e flexão. A partir das caracterizações efetuadas foi concluído que as fibras de CB se comportam, eficazmente, como reforço mecânico.

**Palavras-chave:** Celulose bacteriana, *Phyllobacterium myrsinacearum*, poli( $\epsilon$ -caprolactona), *scaffolds* por impressão 3D



# Abstract

Usually biomaterials used in tissue engineering are polymers. Given the demand for biodegradable materials, mainly those of natural source, biopolymers produced by bacteria are, according to the literature, suitable for biomedical applications. Besides biocompatibility, scaffolds require a superior thermomechanical performance when compared to biodegradable polymers. As an answer to this challenge, composite materials of polymeric matrix reinforced with natural fibers are produced.

In the present study, the biopolymer produced by the bacteria *Phyllobacterium myrsinacearum*, which was never reported in scientific literature or patents, was evaluated. The characterization revealed that bacterial cellulose (BC) is, instead of all cellulose produced by bacteria in literature, hydrophobic. The biopolymer consists of fibrils of micrometric length and nanometric diameter, and presents semicrystalline structure. It also presents superior mechanical properties compared to those reported in the literature, namely those which concern elastic modulus and hardness.

The CB-reinforced poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocomposites were produced by *ex situ* modification and printed by additive manufacturing (3D printing). The homopolymers (PCL 6800/CB e PCL 8502A/CB) and composites (PCL 6800/CB e PCL 8502A/CB) were characterized by their crystallinity, chemical structure, thermal behaviour and wettability. The mechanical properties were evaluated by tensile and flexural tests. After characterization it was concluded that BC fibers acted, effectively, as a mechanical reinforcement.

**Keywords:** Bacterial cellulose, *Phyllobacterium myrsinacearum*, poly( $\epsilon$ -caprolactone), 3D printed scaffolds





# Índice

<b>Lista de Figuras</b>	<b>xvii</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xxi</b>
<b>Simbologia</b>	<b>xxiii</b>
<b>Algumas siglas</b>	<b>xxv</b>
<b>Introdução</b>	<b>1</b>
<b>1 Estado da Arte</b>	<b>3</b>
1.1 Engenharia de tecidos . . . . .	3
1.2 Biomateriais . . . . .	4
1.2.1 Materiais poliméricos . . . . .	4
1.2.2 As bactérias como fornecedoras de matéria-prima . . . . .	5
a) Celulose bacteriana . . . . .	6
1.2.3 A poli( $\epsilon$ -caprolactona) . . . . .	9
1.2.4 Celulose bacteriana em compósitos . . . . .	11
a) Modificação por dissolução . . . . .	12
b) Modificação <i>in situ</i> . . . . .	13
c) Modificação <i>ex situ</i> . . . . .	14
<b>2 Materiais e Métodos Experimentais</b>	<b>17</b>
2.1 Produção da CB e dos Compósitos . . . . .	17
2.1.1 Meios e condições de cultivo . . . . .	17
2.1.2 Metodologia de Extração da CB . . . . .	18
2.1.3 Preparação de Compósitos com CB . . . . .	19
2.2 Técnicas de Caracterização . . . . .	20
2.2.1 Microscopia Eletrónica de Varrimento . . . . .	20
2.2.2 Microscopia de Força Atómica . . . . .	21
2.2.3 Microscopia de Foco Infinito . . . . .	21
2.2.4 Difração de raios X . . . . .	22

2.2.5	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	22
2.2.6	Espectroscopia do Foloeletrão X . . . . .	23
2.2.7	Ressonância Magnética Nuclear . . . . .	24
2.2.8	Calorimetria Diferencial de Varrimento e Análise Termogravimétrica . . . . .	24
2.2.9	Análise Termo Mecânica Dinâmica . . . . .	25
2.2.10	Molhabilidade . . . . .	25
2.2.11	Propriedades mecânicas . . . . .	26
a)	Ensaio de Tração Uniaxial . . . . .	26
b)	Ensaio de Flexão . . . . .	27
c)	Nanoindentação . . . . .	28
2.3	Testes <i>in vitro</i> . . . . .	29
<b>3</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>31</b>
3.1	Caracterização da CB . . . . .	31
3.1.1	Morfologia/Topografia . . . . .	31
3.1.2	Análise estrutural . . . . .	33
3.1.3	Análise química . . . . .	34
3.1.4	Propriedades mecânicas . . . . .	40
3.2	Caracterização dos compósitos . . . . .	41
3.2.1	Topografia . . . . .	42
3.2.2	Análise estrutural . . . . .	42
3.2.3	Análise química . . . . .	44
3.2.4	Análise térmica . . . . .	47
3.2.5	Molhabilidade . . . . .	52
3.2.6	Propriedades mecânicas . . . . .	53
a)	Ensaio de Tração Uniaxial . . . . .	53
b)	Ensaio de Flexão . . . . .	63
3.2.7	Testes <i>in vitro</i> . . . . .	65
	<b>Conclusões</b>	
	<b>Referências bibliográficas</b>	
	<b>Apêndice A - SEM</b>	<b>A1</b>
	<b>Apêndice B - DMTA</b>	<b>B1</b>
	<b>Anexo A - Ficha ICDD</b>	<b>A1</b>

# Lista de Figuras

1.1	Estrutura molecular da celulose. . . . .	7
1.2	Representação esquemática da célula unitária (A) triclinica e (B) monoclinica, cujo $\gamma$ é um ângulo obtuso. . . . .	9
1.3	Estrutura molecular da PCL. . . . .	10
1.4	Estrutura molecular da PCL diol. . . . .	11
1.5	Modificações da CB: (A) dissolução, (B) <i>in situ</i> , (C) <i>ex situ</i> . . . . .	12
2.1	Esquema da impressão longitudinal (A) e transversal (B) dos provetes contínuos e dos provetes porosos (C). . . . .	20
2.2	Resumo das propriedades mecânicas, a partir de uma curva tensão-deformação. . . . .	27
3.1	Morfologia da superfície da CB numa zona de fratura. . . . .	31
3.2	Morfologia da superfície da CB (superfície de secagem). . . . .	32
3.3	Espectro de EDS da CB. . . . .	32
3.4	Imagens topográficas AFM da CB (A e B) e exemplo do perfil 2D (C). . . . .	33
3.5	Difratograma da CB . . . . .	34
3.6	Região de interesse do C1s. . . . .	36
3.7	Região de interesse do O1s. . . . .	36
3.8	Região de interesse do N1s. . . . .	36
3.9	Estrutura molecular da celulose. . . . .	37
3.10	Espectro completo de $^1\text{H}$ RMN da CB. . . . .	37
3.11	Espectro de $^1\text{H}$ RMN do anel da CB. . . . .	38
3.12	Espectro geral de $^{13}\text{C}$ RMN da CB. . . . .	39
3.13	Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN da CB. . . . .	39
3.14	Curva da carga e descarga do ensaio de nanoindentação da CB. . . . .	41
3.15	Imagens óticas dos provetes porosos de PCL 6800 (A) e respetivo perfil (C) e de PCL 8502A (B) e respetivo perfil (D). . . . .	42
3.16	Difratograma da PCL 6800 a preto e do PCL6800/CB a vermelho. . . . .	43

3.17 Difratoograma da PCL 8502A a preto e do PCL8502A/CB a vermelho.	43
3.18 Espectro de FTIR da CB.	45
3.19 Espectro de FTIR da PCL 6800 (escuro) e respetivo compósito (claro).	45
3.20 Espectro de FTIR da PCL 8502A (escuro) e do seu compósito (claro).	45
3.21 Termograma de DSC e TGA da CB.	47
3.22 Curva de DSC da PCL 6800 e respetivo compósito.	48
3.23 Curva de DSC da PCL 8502A e respetivo compósito.	48
3.24 Curva de DMTA da PCL 6800 e respetivo compósito (Frequência=1Hz).	49
3.25 Curva de DMTA da PCL 8502A e respetivo compósito a uma frequência de 1Hz (A) e 10 Hz (B).	50
3.26 Ensaio de tração dos provetes impressos longitudinalmente.	54
3.27 Ensaio de tração dos provetes impressos transversalmente.	54
3.28 Curvas tensão-deformação da PCL 6800 L e PCL 6800/CB L.	55
3.29 Curvas tensão-deformação da PCL 6800 T e PCL 6800/CB T.	55
3.30 Curvas tensão-deformação da PCL 8502A L e PCL 8502A/CB L.	55
3.31 Curvas tensão-deformação da PCL 8502A T e PCL 8502A/CB T.	55
3.32 Gráfico de colunas das propriedades mecânicas obtidas de cada provete.	57
3.33 Provetes porosos de PCL 6800 (A) e PCL 6800/CB (B), antes e após ensaio de tração.	59
3.34 Proвете poroso de PCL 8502A (A) e PCL 8502A/CB (B), antes e após ensaio de tração.	59
3.35 Curvas tensão-deformação dos provetes porosos PCL 6800, sem e com a CB.	60
3.36 Curvas tensão-deformação dos provetes porosos PCL 8502A, sem e com a CB.	60
3.37 Gráfico de colunas das propriedades mecânicas de cada provete poroso.	61
3.38 Morfologia do compósito PCL 6800/CB no local de rotura, após tração.	62
3.39 Morfologia do compósito PCL 6800/CB tracionado.	62
3.40 Morfologia do compósito PCL 6800/CB tracionado.	62
3.41 Curvas força-deslocamento dos provetes porosos PCL 6800, sem e com a CB.	63
3.42 Curvas força-deslocamento dos provetes porosos PCL 8502A e do seu compósito.	63
3.43 Gráfico de colunas das propriedades mecânicas retiradas a partir do ensaio de flexão.	64

3.44	Deformação dos provetes PCL 6800 (A), PCL 6800/CB (B), PCL 8502A (C) e PCL 8502A/CB (D) após ensaio de flexão. . . . .	65
3.45	Absorção de SBF nos quatro tipos de provetes. . . . .	66
3.46	Cinética da degradação dos quatro tipos de provetes ao longo de quatro semanas. . . . .	66





# Lista de Tabelas

1.1	Algumas propriedades da CB. . . . .	7
1.2	Algumas propriedades da PCL. . . . .	10
2.1	Composição iónica da solução SBF. . . . .	30
3.1	Composição química da CB. . . . .	35
3.2	Desvios químicos do espectro de <sup>13</sup> C RMN da CB. . . . .	40
3.3	Bandas do espectro FTIR da CB. . . . .	46
3.4	Bandas do espectro FTIR da PCL. . . . .	46
3.5	Temperaturas de fusão (T <sub>f</sub> ) dos homopolímeros e compósitos. . . . .	48
3.6	Temperaturas de transição vítrea (T <sub>g</sub> ) dos provetes. . . . .	51
3.7	Medição dos ângulos de contacto estáticos da CB, PCL 6800, PCL 8502A e respetivos compósitos. . . . .	52
3.8	Propriedades mecânicas dos provetes sujeitos ao ensaio de tração uniaxial. . . . .	56
3.9	Propriedades mecânicas dos provetes porosos sujeitos ao ensaio de tração uniaxial. . . . .	60
3.10	Propriedades mecânicas dos provetes porosos sujeitos ao ensaio de flexão. . . . .	63
3.11	Degradação percentual dos provetes porosos, ao longo de quatro semanas. . . . .	66



# Simbologia

$T_f$	temperatura de fusão
$T_g$	temperatura de transição vítrea
$C_{mc}$	concentração micelar crítica
$n$	número inteiro
$\lambda$	comprimento de onda da radiação incidente
$d$	distância interplanar
$\theta$	ângulo de incidência dos raios X
$E_b$	energia característica do eletrão da amostra
$h$	constante de Planck
$\nu$	frequência do fóton
$E_k$	energia cinética
$\phi$	função trabalho
$\tan\delta$	amortecimento
$E'$	módulo de armazenamento
$E''$	módulo de perda
$\gamma_{lv}$	tensão interfacial líquido-vapor
$\gamma_{sv}$	tensão interfacial sólido-vapor
$\gamma_{sl}$	tensão interfacial sólido-líquido
$\theta$	ângulo de contacto
$\Delta L$	variação do comprimento
$\sigma$	tensão de tração ou flexão
$F$	carga aplicada
$A$	área transversal

$\epsilon$	deformação
$L_0$	comprimento inicial
$E$	módulo de elasticidade
$\sigma_{max}$	resistência à tração
$\sigma_{rot}$	tensão de rotura
$P$	carga máxima
$L$	comprimento de span
$b$	largura do provete
$h$	espessura do provete
$\Delta P$	intervalo da carga aplicada
$\Delta u$	variação do deslocamento de flexão a meio do span
$I$	momento de inércia da secção transversal
$H_v$	dureza Vickers

# Algumas siglas

AFM	microscopia de força atômica
BNC	nanocelulose bacteriana
CB	celulose bacteriana
CNC	nanocristais de celulose
CNF	nanofibras de celulose
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DMTA	análise termo mecânica dinâmica
DSC	calorimetria diferencial de varrimento
ECM	matriz extracelular
EDS	espectroscopia por dispersão de energia
ET	engenharia de tecidos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier
IFM	microscopia de foco infinito
PCL	poli( $\epsilon$ -caprolactona)
RMN	ressonância magnética nuclear
SBF	fluido corporal simulado
SEM	microscopia eletrônica de varrimento
TGA	análise termogravimétrica
THF	tetrahidrofurano
XPS	espectroscopia do fotoeletrão X
XRD	difração de raios X





# Introdução

Nas últimas décadas a crescente preocupação pelo meio ambiente tem conduzido à substituição de materiais derivados do petróleo por outros biodegradáveis de origem natural. Em aplicações médicas ou relacionadas, para além da degradação hidrolítica ou enzimática, outro requisito essencial é a biocompatibilidade. As duas propriedades são conseguidas quando um implante é capaz de gerar uma resposta adequada no hospedeiro para uma determinada aplicação sendo designado, desse modo, biomaterial. Dada a enorme versatilidade das propriedades mecânicas e de degradabilidade dos materiais poliméricos, estes têm vindo a substituir outras classes de materiais como os metais, ligas metálicas e cerâmicos, em aplicações biomédicas, como a engenharia de tecidos. Os biomateriais utilizados na engenharia de tecidos consistem em *scaffolds* tridimensionais que permitem o crescimento celular, de modo a criar novos tecidos com estrutura e função apropriadas. Para além de mimetizarem a função biológica e física da matriz extracelular nativa do tecido/órgão e, portanto, potenciar a formação do novo tecido, os biomateriais devem servir de suporte sem que sejam induzidos processos inflamatórios severos.

A formação de compósitos tem por base o desempenho termomecânico inferior dos polímeros naturais comparativamente com os polímeros derivados do petróleo. Esta abordagem visa obter desempenhos semelhantes ou superiores aos dos materiais poliméricos, por exemplo, através de reforços de fibras naturais que apresentam como vantagens o baixo custo, baixa densidade e biodegradação. Neste contexto, a celulose é um dos tipos de fibra que é abundantemente utilizado como reforço em compósitos de matriz polimérica. A celulose é um polímero natural produzido por plantas, a mais conhecida e utilizada, mas também por bactérias. A grande vantagem da celulose produzida por micro-organismos é a sua pureza em relação ao polímero extraído de plantas que vem contaminado com vários outros constituintes como, por exemplo, a lignina. Dada a sua semelhança estrutural com alguns componentes de matriz extracelular, a sua natureza polissacárida, que a torna pouco ou nada imunogénica, e a manipulação durante secreção, a celulose

bacteriana (CB) é um biomaterial cujas aplicações biomédicas incluem pele artificial, tratamento de feridas, sistemas de liberação de fármacos, implantes cardiovasculares entre outros.

No presente estudo, o objetivo é avaliar compósitos de matriz polimérica reforçados com CB para aplicações biomédicas. O biopolímero foi produzido pela espécie bacteriana *Phyllobacterium myrsinacearum*, extraído e caracterizado. Depois de incorporada num polímero sintético poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), os compósitos foram impressos tridimensionalmente, por processo aditivo, e depois caracterizados, incluindo a avaliação das propriedades mecânicas e a degradabilidade *in vitro*.

A dissertação está organizada em três capítulos: no Capítulo 1 é apresentado o estado da arte sobre os compósitos de matriz polimérica reforçados com a CB; no Capítulo 2 são indicados os materiais e métodos experimentais, nomeadamente a metodologia de produção e extração da CB, a obtenção dos provetes através da impressão 3D e a avaliação, tanto da celulose como dos compósitos, por diferentes técnicas de caracterização; por fim, no Capítulo 3 são apresentados e discutidos os resultados.

No término da dissertação são enunciadas as principais conclusões retiradas do presente estudo, sendo igualmente formuladas algumas sugestões que consideramos úteis para uma eventual continuidade do trabalho realizado.

# 1

## Estado da Arte

### 1.1 Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos (ET) é um campo multidisciplinar que inclui áreas como o desenvolvimento de tecidos e a manipulação química, física, farmacológica e genética de células e biomateriais. A ET oferece estratégias para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função normal do tecido e, portanto, solucionem problemas médicos críticos, nomeadamente perda de tecidos e falência de órgãos [1].

Os *scaffolds*, ou andaimes, em ET são definidos como estruturas porosas, geralmente poliméricas, que funcionam como suporte e guia para regeneração de tecidos [2]. A sua estrutura tridimensional promove a adesão, proliferação e diferenciação celulares e a formação de uma matriz extracelular (ECM - do inglês *extracellular matrix*), pelo que devem fornecer um ambiente apropriado à formação de novo tecido [3]. Os *scaffolds* biomiméticos devem (1) mimetizar a ECM do órgão ou tecido que vão substituir, (2) ser capazes de acomodar um elevado número de células de um lado e, se necessário, servir de barreira do outro (estrutura assimétrica) e (3) suportar as solicitações mecânicas durante a neogénese do tecido [4]. Existem duas abordagens em ET: inoculação de células sobre os *scaffolds* que depois comunicam diretamente com as células do tecido hospedeiro, ou são incorporados fatores de crescimento que atraem as células do tecido hospedeiro e o novo tecido é formado ao longo dessa matriz [5]. Por estas razões, a porosidade é uma propriedade crucial que confere uma elevada permeabilidade e promove o fluxo de fluido intersticial, ambos essenciais na resposta de cicatrização [4]. No entanto, é sempre necessário ter em consideração a especificidade do tecido hospedeiro pois há células, por exemplo, as epiteliais, que apenas proliferam sobre superfícies não porosas [4, 6]. Desse modo, os *scaffolds* devem ser uma combinação de uma superfície impermeável com uma estrutura fibrosa porosa do lado seroso. Nesse sentido podem, por um lado,

servir de barreira à saída do fluido intersticial e, por outro, promover a adesão e proliferação celulares [4]. Um *scaffold* ideal deve possuir biocompatibilidade, biodegradabilidade com cinética de degradação controlada, propriedades mecânicas suficientes e química de superfície apropriada [3].

## 1.2 Biomateriais

Um biomaterial pode ser definido como um material destinado a interagir com sistemas biológicos de modo a avaliar, tratar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo [2]. O pré-requisito essencial para qualificar um material como biomaterial é a biocompatibilidade, isto é, a capacidade de um material desenvolver uma resposta adequada no hospedeiro para uma aplicação específica. A resposta do hospedeiro depende de inúmeros fatores incluindo as propriedades químicas, físicas e biológicas dos materiais e também a estrutura do implante [7].

### 1.2.1 Materiais poliméricos

Os materiais poliméricos têm sido amplamente utilizados no fabrico de dispositivos médicos, onde se incluem os *scaffolds* de ET. Os polímeros são macromoléculas constituídas por unidades de repetição (monómeros) unidas por ligações covalentes. A cadeia polimérica pode ser composta por um único tipo de mero ou por dois ou mais tipos, sendo denominado de homopolímero ou copolímero, respetivamente. Quanto à estrutura molecular os homopolímeros classificam-se como lineares, ramificados ou reticulados e os copolímeros como aleatórios, alternados, em bloco ou ramificados [8]. Tanto os polímeros lineares como ramificados são considerados termoplásticos. Por outro lado, os reticulados tridimensionalmente ou em rede são designados como termoendurecíveis (geralmente média a elevada percentagem de reticulação) ou elastómeros (geralmente baixa percentagem de reticulação) [9]. Os polímeros podem ser constituídos por regiões ordenadas (cristalinas) e desordenadas (amorfas) em que a percentagem relativa destas regiões pode ir desde o 100% amorfo ao maioritariamente cristalino (máximo de 95% de cristalinidade). Se, por um lado, a cristalinidade confere resistência mecânica e está associada à temperatura de fusão ( $T_f$ ), por outro, as regiões amorfas contribuem para a flexibilidade que é tanto maior quanto menor for a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). Abaixo da  $T_g$  a flexibilidade diminui substancialmente e as propriedades são mais semelhantes às de um cerâmico amorfo - o vidro [9]. Os polímeros podem ser clas-

sificados quanto à sua origem em naturais ou sintéticos e ainda em degradáveis ou não degradáveis [10].

De entre as diferentes formas que um polímero pode assumir, são de particular relevância para o presente trabalho as fibras. Normalmente, estas possuem elevada resistência mecânica devido à simetria molecular e coesão entre cadeias que requerem um grau elevado de cristalinidade. São normalmente lineares e alinhadas numa dada direção e, conseqüentemente, apresentam propriedades mecânicas superiores quando solicitadas nessa direção [9].

As propriedades/características intrínsecas aos biomateriais poliméricos tais como a química do material, o peso molecular, a hidrofobicidade/hidrofilicidade, a absorção da água e a degradação afetam a sua biocompatibilidade. Dada a complexa e vasta gama de aplicações biomédicas, não existe disponível um sistema polimérico que possa ser considerado como um biomaterial ideal [7]. Por essa razão, ainda são alvo de estudo as técnicas de síntese de polímeros com propriedades únicas e específicas para determinada aplicação [7]. Algumas das atuais aplicações biomédicas de materiais poliméricos biodegradáveis incluem substitutos de enxertos ósseos, sistemas de libertação de fármacos, materiais de suturas reabsorvíveis e estruturas porosas ou multifilamentosas para ET [7, 11].

### **1.2.2 As bactérias como fornecedoras de matéria-prima**

Nos últimos anos o interesse por polímeros naturais cresceu substancialmente, sendo as bactérias um dos exemplos de produtores de inúmeros biopolímeros.

As bactérias produzem um biofilme que consiste num agregado de células microbianas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS - do inglês *Extracellular Polymeric Substances*) [12]. Estes materiais são uma consequência do metabolismo bacteriano que são capazes de converter diferentes fontes de carbono numa larga gama de polímeros, maioritariamente extracelulares, com diversas propriedades mecânicas e químicas [13]. Os polímeros produzidos pelas bactérias servem tanto de reserva como proteção estrutural e podem incluir, entre outros, polissacarídeos, poliésteres, poliamidas ou poli(anidridos) inorgânicos [13]. Os polissacarídeos podem ainda ser divididos em exopolissacarídeos (celulose, dextrano e alginato), intracelulares (glicogénio) e capsulares (antigene K30) [13]. Os exopolissacarídeos são considerados as principais componentes estruturais da EPS [12]. Os biopolímeros são constituídos por componentes naturais não tóxicos e são, desse

modo, biocompatíveis e biodegradáveis [13].

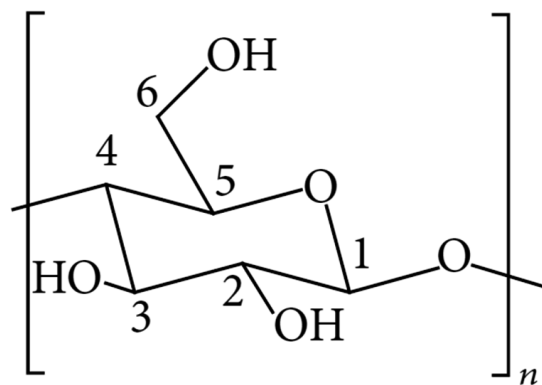
### a) Celulose bacteriana

A celulose é o recurso renovável mais abundante na Terra e produzido por diversos organismos como plantas, bactérias, algas e mesmo algumas espécies animais [14]. A descoberta da celulose bacteriana (CB) ocorreu em 1886 por Brown, o qual observou que o micro-organismo *Bacterium aceti* produzia uma membrana gelatinosa durante a fermentação acética. A membrana que sustinha as células do fermento correspondia, depois de seca, a um filme semitransparente e gelatinoso - a celulose bacteriana. Brown concluiu também que o manitol, quando adicionado ao meio de cultura, potenciava a produção da CB [15]. Os estudos mais intensivos sobre a síntese da CB foram iniciados em 1947 por Hestrin e colaboradores, e a CB foi aprovada pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) em 1996, para aplicações biomédicas incluindo curativos de feridas [16].

Na indústria alimentar a CB é utilizada na produção de nata de coco, a partir da fermentação em água de coco, e em materiais de embalagem como proteção e preservação dos alimentos. A escolha de materiais bio derivados em detrimento de materiais derivados de petróleo deve-se ao menor impacto ambiental [17].

A celulose é um homopolissacarídeo linear constituído por moléculas de D-glicose unidas por ligações glicosídicas  $\beta - 1,4$  (Figura 1.1). O seu precursor é a UDP-D-glicose e a celulose sintetase é a enzima responsável pela sua polimerização [18]. As bactérias Gram-negativas são as produtoras de CB mais eficientes e, a única espécie, reportada até hoje, capaz de produzir em quantidades comerciais é a *Acetabacter xylium* [15, 18, 19].

Para além do género *Acetobacter*, outros produzem o mesmo biopolímero, nomeadamente *Achromobacter*, *Aerobacter* e *Rhizobium* [18]. O género *Phyllobacterium* foi o utilizado neste estudo e nunca é referenciado na literatura, tanto em artigos científicos como em patentes, como produtor de celulose.



**Figura 1.1:** Estrutura molecular da celulose, adaptado de [20].

Ao contrário da celulose derivada de plantas, a bacteriana é quimicamente pura, ou seja, não está associada a hemicelulose ou lignina [16, 18, 21]. Apresenta elevada área de superfície, devido ao reduzido diâmetro de fibra, excelente resistência mecânica e biocompatibilidade [14, 19, 22, 23]. Apesar das propriedades químicas serem semelhantes às da celulose vegetal, as suas propriedades físicas superiores tornam a CB um candidato promissor em diversas áreas, entre as quais a biomédica [22]. Comparando ainda com outros polímeros biodegradáveis como o colagénio, quitina e gelatina, a CB apresenta propriedades mecânicas superiores [24]. Algumas das propriedades térmicas e mecânicas da celulose estão na Tabela 1.1.

**Tabela 1.1:** Algumas propriedades da CB.

Propriedades		Referências
Temperatura de transição vítrea (°C)	220 - 250	[25]
Resistência à tração (MPa)	200 -300	[26]
Módulo de elasticidade (GPa)	15 - 35	[26]

A elevada ordem estrutural da celulose cristalina, a elevada densidade de ligações covalentes e de pontes de hidrogénio, a nível intra e intermoleculares, estão na origem do elevado valor de resistência à tração [27].

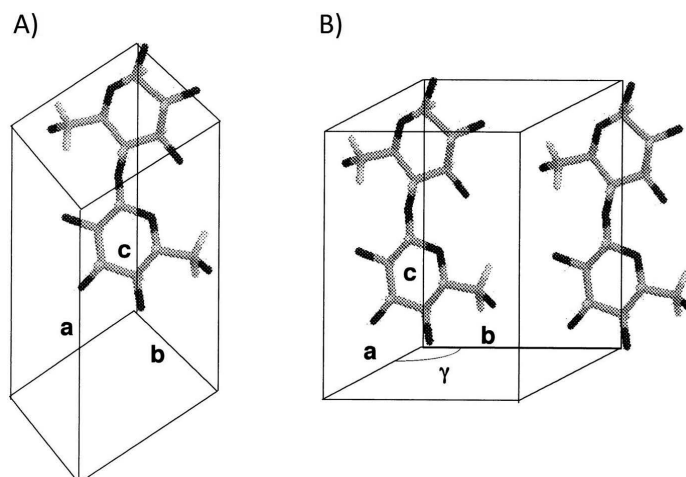
Durante a síntese da CB, as cadeias de glicose são extrudidas através de pequenos poros presentes no envelope celular das bactérias. As cadeias individuais ligam-se por pontes de hidrogénio, forças van der Waals e complementaridade estérica, e formam nanofibras que, por sua vez, se agregam em microfibras (*ribbons*). Estas organizam-se de modo a formar uma estrutura em rede com espaços vazios

entre elas [22, 28]. A nanocelulose pode ser designada, segundo a sua morfologia, estrutura e dimensões, em nanocristais de celulose (CNC do inglês *Crystalline nanocellulose*), nanofibras de celulose (CNF do inglês *Cellulose nanofibers*) ou nanocelulose bacteriana (CB ou BNC do inglês *Bacterial nanocellulose*) [29, 30].

A produção deste biopolímero tanto pode ocorrer em culturas estacionárias como agitadas. Nas primeiras, a CB é produzida na interface do ar e do meio de cultura, na forma de filme permeável, para que as bactérias recebam o oxigénio necessário à atividade metabólica [26, 31]. A membrana gelatinosa torna-se transversalmente isotrópica, dado que possui uma maior densidade e emaranhamento paralelamente à interface ar/meio do que na direção do crescimento [4, 31]. Apesar de em culturas agitadas a produção de CB ser mais rápida, e com maior rendimento devido ao contacto permanente com o oxigénio, o grau de polimerização e consequentes cristalinidade e resistência mecânica são inferiores [22]. A CB aglomera-se sob a forma de grânulos irregulares e cadeias estelares e fibrosas que reticulam num padrão com orientações tanto paralelas como perpendiculares [18].

Quando se considera a forma como as cadeias de celulose se organizam espacialmente há, essencialmente, dois tipos, a celulose I e a celulose II. Enquanto que na primeira as cadeias de glucose se organizam paralelamente, na segunda as cadeias são dispostas aleatoriamente. A celulose II consiste, portanto, em cadeias antiparalelas ligadas por um elevado número de pontes de hidrogénio, o que a torna termodinamicamente mais estável [18]. Ainda é possível distinguir a celulose  $I_{\alpha}$ , dominante na celulose produzida por algas e bactérias, e  $I_{\beta}$ , predominante na celulose da madeira. A celulose  $I_{\alpha}$  é estruturalmente caracterizada por uma célula unitária triclinica apenas com uma cadeia (Figura 1.2 A), enquanto a  $I_{\beta}$  tem como célula unitária uma estrutura monoclinica com duas cadeias paralelas (B) [32]. Quando produzida em culturas estáticas, a CB apresenta uma maior fração mássica de celulose  $I_{\alpha}$ , que está intimamente relacionado com o tamanho da cristalite [18].





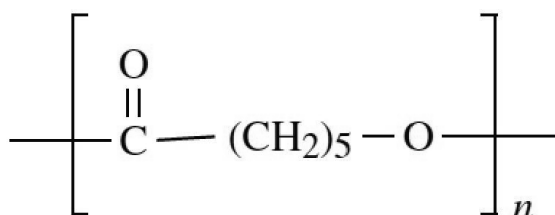
**Figura 1.2:** Representação esquemática da célula unitária (A) triclínica e (B) monoclínica, cujo  $\gamma$  é um ângulo obtuso. Adaptado de [33].

Não obstante as suas vantagens em ET, a CB não apresenta propriedades antimicrobianas, transparência e condutividades térmica e elétrica [22, 34, 35]. A sua natureza hidrófila e preenchimento do volume livre existente por moléculas de água podem causar uma redução das propriedades de barreira em comparação com outros polímeros [36].

### 1.2.3 A poli( $\epsilon$ -caprolactona)

O polímero sintético poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) foi sintetizado pela primeira vez em 1934 e a sua primeira aplicação médica foi em fios de sutura (Maxon®) [37, 38]. A sua estrutura molecular está representada na Figura 1.3. A PCL é um poliéster alifático semicristalino, biocompatível e biodegradável [39]. A sua degradação é lenta devido à presença dos grupos etil ( $-\text{CH}_2$ ) que aumentam a hidrofobicidade e diminuem a velocidade de hidrólise [40]. A sua biodegradação ocorre em bactérias e fungos e em humanos apenas quando apresenta reduzido peso molecular [38]. Dependendo do peso molecular, a degradação da PCL pode variar entre 2 e 4 anos e inclui dois estágios. No primeiro ocorre uma hidrólise não enzimática dos grupos éster; no segundo, quando o polímero é mais cristalino e de baixo peso molecular médio ponderal (inferior a 3000 g/mol), ocorre degradação intracelular, sendo completamente reabsorvível e degradado [38]. As moléculas de água que difundem para o interior do polímero potenciam a clivagem aleatória das ligações éster da PCL que, por sua vez, origina a formação de grupos carboxílicos ( $-\text{COOH}$ ) e hidroxílicos ( $-\text{OH}$ ). Enquanto que os oligómeros e monómeros presentes na superfície difundem

facilmente, os produtos da autocatálise podem ser acumulados no polímero. Consequentemente, este acidifica e a degradação interna é acelerada quando comparada com a degradação superficial. Com o decorrer da degradação, o pH é neutralizado, os oligómeros difundem e o peso molecular do polímero diminui. Do número reduzido de polímeros sintéticos reabsorvíveis aprovados pela FDA, a degradação da PCL é mais lenta que a do poli(ácido láctico) (PLA), do poli(ácido glicólico) (PGA) e dos respectivos copolímeros. Por essa razão é adequado para aplicações a longo prazo como entrega de moléculas encapsuladas por um período superior a um ano [38].



**Figura 1.3:** Estrutura molecular da PCL, adaptado de [41].

À temperatura ambiente a PCL é solúvel em clorofórmio e diclorometano e apresenta baixa solubilidade em acetona, dimetilformamida, tetrahydrofurano, 1-metil-2-pirrolidona e é insolúvel em dimetilsulfóxido [42]. Comparando com outros polímeros sintéticos biodegradáveis, a PCL apresenta propriedades mecânicas superiores, nomeadamente o módulo de elasticidade e resistência mecânica, que são dependentes do seu peso molecular [3]. Também a excepcional compatibilidade como elemento de mistura em materiais compósitos e com tecidos moles e duros tornam-no um ótimo polímero para aplicações biomédicas, nomeadamente em enxertos vasculares e ósseos, suturas reabsorvíveis e sistemas de libertação de fármacos [3, 11, 42]. Algumas das propriedades térmicas e mecânicas da PCL estão enumeradas na Tabela 1.2.

**Tabela 1.2:** Algumas propriedades da PCL.

Propriedades	Referências	
Temperatura de fusão (°C)	59-64	[3]
Temperatura de transição vítrea (°C)	-60	[3]
Resistência à tração (MPa)	1,6 - 2,1	[43]
Módulo de elasticidade (MPa)	4,98	[44]

No mercado existem algumas variantes de PCL, que incluem diferentes pesos

moleculares e modificações químicas. Um dos exemplos é a poli( $\epsilon$ -caprolactona) diol que tem dois grupos hidroxílicos por molécula (Figura 1.4).



**Figura 1.4:** Estrutura molecular da PCL diol, adaptado de [45].

### 1.2.4 Celulose bacteriana em compósitos

Na maior parte das vezes os polímeros biodegradáveis, por si só, não reúnem as propriedades adequadas para determinada aplicação. Surge, por esse motivo, a necessidade de preparar materiais compósitos com desempenhos superiores.

Os compósitos são geralmente constituídos por uma matriz, ou fase contínua, que circunda uma fase descontínua ou dispersa [8, 9]. Normalmente a fase dispersa é um reforço, na medida em que melhora as propriedades físico-químicas e biológicas da matriz [22]. Os compósitos podem ser divididos em orgânicos, no caso da matriz ser de materiais poliméricos, e inorgânicos se a matriz for metálica ou cerâmica [22]. As fibras de celulose são utilizadas em muitos compósitos como reforço devido à elevada rigidez e resistência mecânica deste material [27].

Tendo como objetivo obter as propriedades adequadas para determinada aplicação, é possível realizar três modificações (Figura 1.5): a dissolução da CB (A) resulta em distribuições homogêneas mas, devido à sua natureza polar, a solubilidade é limitada [22]; modificação *in situ* (B), segundo a qual moléculas exógenas são adicionadas ao meio de cultura da CB no início da incubação microbiana e, portanto, as propriedades biofísicas da CB são modificadas [26]; por fim, a modificação *ex situ* (C) consiste na adição de moléculas exógenas após a produção e purificação da CB, cuja estrutura nativa não é alterada [26]. Ao longo dos últimos anos têm sido reportados estudos sobre compósitos poliméricos reforçados com CB. Alguns desses estudos são sumariados de seguida.

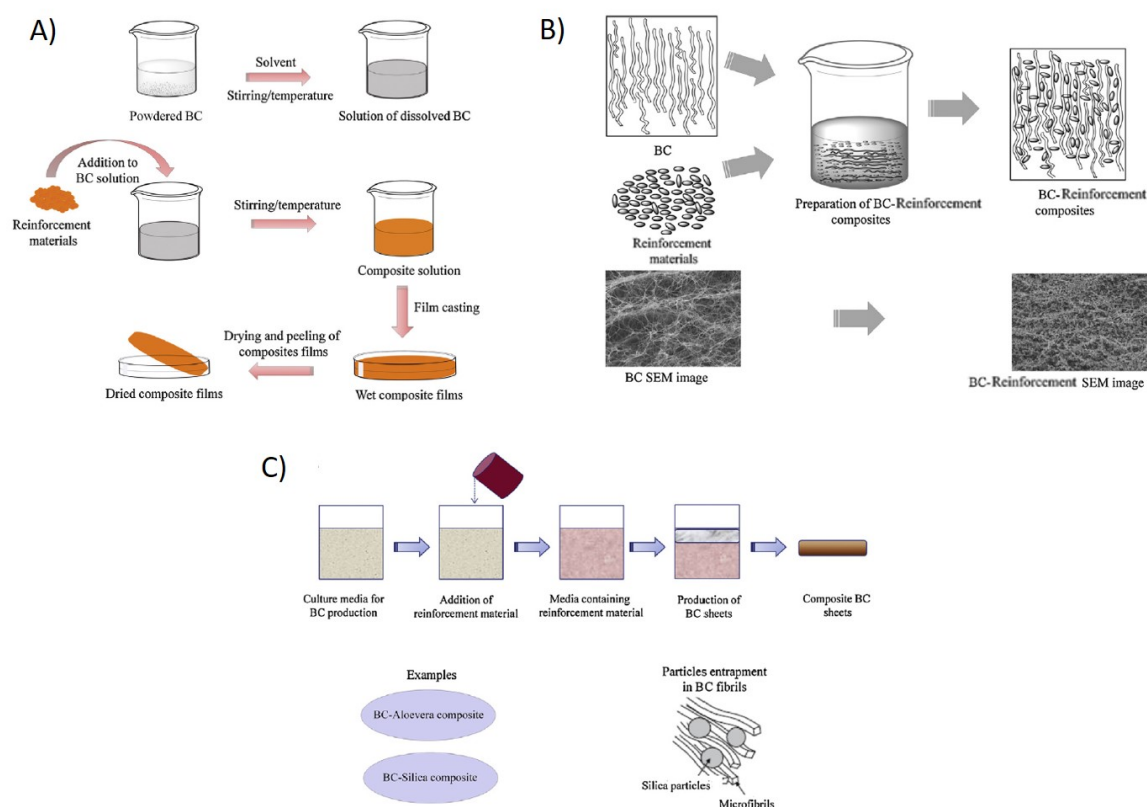


Figura 1.5: Modificações da CB: (A) dissolução, (B) *in situ*, (C) *ex situ*, adaptado de [22].

### a) Modificação por dissolução

A celulose é uma molécula polar constituída por grupos -OH, o que a torna insolúvel em solventes orgânicos não polares. A insolubilidade em água deve-se às fortes ligações de hidrogénio intra e intermoleculares, pelo que é solúvel apenas em líquidos iónicos e outros solventes capazes de clivar essas pontes de hidrogénio [46].

Wu e colaboradores colocaram pedaços de uma membrana hidratada de CB em N,N-dimetilacetamida (DMAc)/cloreto de lítio (LiCl). Depois de dissolvida, foram preparados microfibrilamentos de CB regenerada (RBC/CB) por *wet spinning*. Os microfibrilamentos de RBC/CB apresentaram um desempenho mecânico e área superficial superiores e cristalinidade inferior que a CB original. Apesar de não terem apresentado citotoxicidade e a degradabilidade enzimática ter sido mais rápida, resíduos de iões de lítio ( $\text{Li}^+$ ) e de solvente permaneceram após tratamento [47].

Devido à reduzida dissolução da CB e dificuldade em remover vestígios dos solventes mais utilizados, as técnicas mais comuns são as modificações *in situ* e *ex*

*situ*.

### **b) Modificação *in situ***

Segundo a técnica *in situ* (1) um monómero é impregnado na rede da CB e polimerizado *in situ*, (2) um polímero solúvel é adicionado ao meio de cultura no início da biossíntese ou (3) nanopartículas são introduzidas durante a síntese bacteriana onde a CB serve de matriz [48]. Esta via de modificação tem sido cada vez mais comum devido à interação entre a CB e o segundo material, o que resulta em dispersões melhoradas e em compósitos mais homogêneos.

Compósitos de CB com diferentes monómeros acrílicos foram preparados através da acidificação da sua superfície. Os monómeros utilizados foram 2-hidroxi-etilmetacrilato (HEMA), ácido itacônico (IA), ácido sulfônico 2-acrilamida-2-metilpropano (AMPSA) e as misturas de HEMA-IA e HEMA-AMPSA. Em todos eles não foi observada citotoxicidade *in vitro* significativa [19]. Noutro estudo foi realizada a polimerização radicalar *in situ* de HEMA com o agente reticulante poli(etileno glicol) diacrilato (PEGDA), que deu origem à formação de um nanocompósito CB/PHEMA homogêneo, mais hidrofílico e biocompatível. No entanto, comparando com a CB pura, o compósito apresentou uma redução da estabilidade térmica e da rigidez [49]. Segundo o mesmo tipo de polimerização, Gadim e colaboradores produziram membranas de CB com poli(4-estireno ácido sulfônico) (PSSA), na presença do agente reticulante PEGDA. As membranas modificadas apresentaram uma boa capacidade de troca iônica e estabilidades térmica e mecânica [50]. Por polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP) *in situ*, membranas de CB foram funcionalizadas e depois reticuladas com monómeros de metacrilato de metilo (MMA) (BC-g-PMMA), acrilato de n-butilo (BA) (BG-g-PBA) e ambos (BC-g-PMMA-co-PBA). Os compósitos porosos pretendiam ser aplicáveis em sistemas de libertação controlada de fármacos ou de outras substâncias bioativas [51]. Para além dos monómeros, já enunciados, para a polimerização *in situ* na presença da CB, também foram utilizados oligómeros de ácido láctico (OLLA) através do mesmo tipo de modificação [52], bem como monómeros de estireno [53], monómeros de acrilamida (AM) para síntese de nanopartículas de prata [54] e oligómeros de ácido glucorónico (SSGO) [21].

A adição de polímeros ao meio de cultura da CB é uma das metodologias mais reportada na literatura. Um dos polímeros utilizados foi o poli(óxido de etileno) (PEO) que originou a formação de nanocompósitos de superfície suave e termica-

mente mais estáveis [55]. Figueiredo e colaboradores prepararam filmes homogêneos de CB/PCL ( $M_n=50000\text{g/mol}$ ), através da prensagem de CB/PCL, a seco, em placas quentes, com propriedades mecânicas superiores ao PCL puro [40]. Outro exemplo é o do poli(álcool vinílico) (PVA) que, quando adicionado ao meio de cultura, comportou-se como um plastificante e, comparativamente à membrana pura de CB, o nanocompósito possuiu um menor valor de módulo de elasticidade e superior dureza [56]. Diferentes aditivos como carboximetil celulose (CMC), pectina, gelatina, amido de milho e licor de milho foram incluídos no meio de cultura de modo a alterar as propriedades da CB. Enquanto que a capacidade de retenção de água foi superior aquando da adição de gelatina, CMC e pectina, as propriedades mecânicas à compressão foram superiores apenas com a adição de pectina, enquanto que a melhoria da resistência à tração foi conseguida com a adição de gelatina [14]. Também o amido da batata foi adicionado ao meio de cultura da CB tendo em vista a produção de *scaffolds* incubados com células para regeneração de defeitos uretrais [4]. Entre outros exemplos de biopolímeros estudados como matriz, o colagénio alterou tanto as propriedades morfológicas da CB como a cristalinidade [57].

### c) Modificação *ex situ*

Por modificação *ex situ* entende-se a sua modificação após ser produzida e retirada do meio de cultura, tais como os exemplos de uma membrana de CB ser impregnada em soluções poliméricas ou em dispersões de nanopartículas. Um exemplo da preparação de membranas transparentes de nanocompósitos poliméricos é por pós impregnação. Barud e colaboradores embeberam uma membrana de CB numa solução de PCL ( $M_n=2000\text{g/mol}$ ) em acetona, que atuou como um plastificante, na medida em que aumentou a mobilidade das cadeias de celulose [39]. Num outro estudo, quando colocada numa solução de poli(3-hidroxiбутирато) (PHB) em clorofórmio, a membrana resultante apresentou uma melhoria nas propriedades térmicas e mecânicas [58]. Por evaporação de solvente, Urbina e colaboradores imergiram membranas de CB hidratadas em clorofórmio contendo poli(ácido láctico) (PLA). O poli(etileno glicol) (PEG) foi também adicionado à solução com o objetivo de melhorar a compatibilidade entre a CB hidrófila e o PLA hidrófobo. As propriedades mecânicas da celulose foram mantidas e a degradação do compósito ocorreu mais rapidamente que a do PLA puro [36]. Ainda por modificação *ex situ*, membranas de CB foram imersas em soluções do copolímero poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxi valerato) (PHBV) em clorofórmio, de modo a formar compósitos de CB/PHBV biocompatíveis [19]. Chang e colaboradores produziram,

a seco, biofilmes constituídos por quitosano e alginato em três tipos de CB (CB pura (BC/Chi/Alg), CB oxidada por hidrogênio peroxidase (HOBC/Chi/Alg) e CB oxidada por ácido periódico (POBC/Chi/Alg). As propriedades mecânicas e a biocompatibilidade do filme HOBC/Chi/Alg tornaram-no o material mais apropriado, dentro dos preparados, para revestimento de feridas bem como para sistemas de libertação controlada de fármacos [59]. Depois de imersa numa solução de quitosano (Chi), uma membrana de CB/Chi foi liofilizada. O compósito formado apresentou uma menor cristalinidade que a CB pura mas uma estabilidade térmica e biocompatibilidade mais elevadas [35]. Outro exemplo são hidrogéis de CB reforçados com PCL, PLA, PMMA e acetato de celulose (CA) que foram submetidos a precipitação e extração simultânea do anti-solvente por fluídos supercríticos usando dióxido de carbono (ssCO<sub>2</sub>). O único aerogel que colapsou foi o de CB/PCL e a utilização da CB como *scaffolds* temporários para obtenção de aerogéis porosos de PMMA torna esta metodologia promissora, na medida em que apresentaram uma morfologia semelhante à do tecido hospedeiro [31]. Silva e colaboradores procederam à copolimerização de PEG em nanocelulose bacteriana. De modo a facilitar a copolimerização, a nanocelulose foi mercerizada, isto é, foi submetida a um tratamento alcalino que aumentou a sua área de superfície. Deste modo, os nanofilmes apresentaram uma maior hidrofiliabilidade e biocompatibilidade [28].

A celulose bacteriana referida na literatura, tanto como reforço ou matriz de compósitos ou como material homotético, é hidrófila, o que nem sempre é ideal para certas aplicações. Tendo como objetivo ultrapassar a sensibilidade à humidade da CB e, portanto, aumentar a resistência à água e diminuir a permeabilidade do vapor de água, a CB pode ser modificada quimicamente. Um dos exemplos é a acilação da celulose microfibrilada, derivada da madeira, em N,N-dimetilformamida (DMF) com cloreto de hexanoílo (HC) em moinho de bolas. Para além das propriedades mecânicas superiores, o filme modificado apresentou hidrofobicidade e compactação [60].

Neste trabalho foram produzidos compósitos de base PCL, reforçados com o biopolímero sintetizado pelo *Phyllobacterium myrsinacearum* (*P. myrsinacearum*), por modificação *ex situ*.





# 2

## Materiais e Métodos Experimentais

### 2.1 Produção da CB e dos Compósitos

#### 2.1.1 Meios e condições de cultivo

Neste estudo foi utilizada a bactéria Gram-negativa *Phyllobacterium myrsinacearum* 20M4 (*P. myrsinacearum*). Os meios de cultura utilizados foram Luria-Bertani (LB) e Hestrin-Schramm (HS) suplementado com manitol. A composição do meio sólido de LB é (g/L): triptona (10 g), extrato de levedura (5 g), cloreto de sódio (5 g) e agár (15 g). O meio líquido HS suplementado tem a seguinte composição (g/L): glucose (20 g), extrato de levedura (5 g), triptona (5 g), ácido cítrico (2,7 g), fosfato hidrogenado dissódico (1,17 g) e, por fim, manitol (10 g). O pH do meio HS foi neutralizado com hidróxido de sódio (NaOH) e a sua densidade ótica foi de  $DO_{600nm} = 0,353$  (espectrofotômetro modelo Evolution 260 BIO, ThermoScientific). O processo de autoclavagem teve uma duração de 20 minutos, a 121 °C e a uma pressão de 100 kPa (1 bar).

A bactéria foi inicialmente cultivada em meio sólido LB, através da técnica *streak plate*, tendo a incubação ocorrido durante 48 horas, a 30 °C e 130 rotações por minuto (rpm). Foi preparado um pré-inóculo em 100 mL de meio líquido LB (sem agár), transferindo a partir do meio sólido LB uma ansa de material biológico. A incubação decorreu durante 48 horas, a 30 °C e 130 rpm. As bactérias foram depois inoculadas em 1 L de meio líquido HS. A incubação teve uma duração de uma semana, a 30 °C e 150 rpm. Numa etapa seguinte, e de modo a aumentar a quantidade de CB produzida, o volume do meio HS foi aumentado para 3L.

### 2.1.2 Metodologia de Extração da CB

Após o cultivo das bactérias, o polímero contido na matriz extracelular foi extraído por centrifugação do meio inoculado, de forma a sedimentar as células e a matriz polimérica. Foi depois realizado um tratamento alcalino da amostra (metodologia adaptada de [61]).

A primeira centrifugação do meio inoculado (de volume total 3,09 L) foi realizada durante 10 minutos a 10000 rpm em tubos de vidro com capacidade máxima de 175 mL (centrífuga marca Beckam modelo J2-HS, rotor modelo JA-14), de forma a recolher células e matriz polimérica. Depois do sobrenadante ter sido descartado, ressuspendeu-se o material biológico sedimentado em 30 mL de NaOH (0,1 M), e transferiu-se a suspensão para novos tubos (com capacidade de 50 mL). As amostras foram incubadas em banho-maria a 80 °C, durante 30 minutos, de forma a promover a lise celular das bactérias e a hidrólise de proteínas, DNA e lípidos. Após esse passo, a suspensão apresentava um sobrenadante de cor branca e aspeto viscoso. Seguiu-se uma centrifugação de 30 minutos a 4000 rpm (centrífuga marca Eppendorf modelo Centrifuge 5810R) de modo a sedimentar os polímeros de hidratos de carbono. Este processo foi repetido três vezes, sendo que entre as centrifugações e entre cada lavagem, o sobrenadante era aspirado com o auxílio de uma pipeta. Depois do processo de lavagem com NaOH ter sido concluído, procedeu-se a uma lavagem com água destilada, de modo a remover os vestígios de NaOH. Após nova centrifugação e remoção do sobrenadante, foi transferido 1 mL de água desionizada para ressuspender o precipitado. O material foi distribuído por moldes de silicone que ficaram à temperatura ambiente para evaporar a água. Em seguida foram colocados na estufa a 50 °C durante algumas horas, sem deixar que o material secasse completamente.

Apesar da lavagem com NaOH ser o procedimento mais descrito na literatura pode, por vezes, alterar algumas das propriedades da CB produzida. Por este motivo, num dos ensaios foi tentada a abordagem com o detergente Triton X-100. Este detergente, quando em contacto com as células, destabiliza a membrana celular ao introduzir-se na bicamada lipídica, o que provoca a lise celular. Com o objetivo de estudar esta abordagem, foi utilizado Triton X-100 1 g/L (5000 ppm, com  $C_{mc}=0,2$  g/L). Depois de se terem realizado duas centrifugações, seguidas de lavagens com o detergente em banho-maria a 80 °C durante 30 minutos, uma pequena amostra foi observada ao microscópio ótico, tendo sido possível observar que não tinha ocorrido lise bacteriana. Por este motivo, todas as etapas de lavagem realizadas durante este

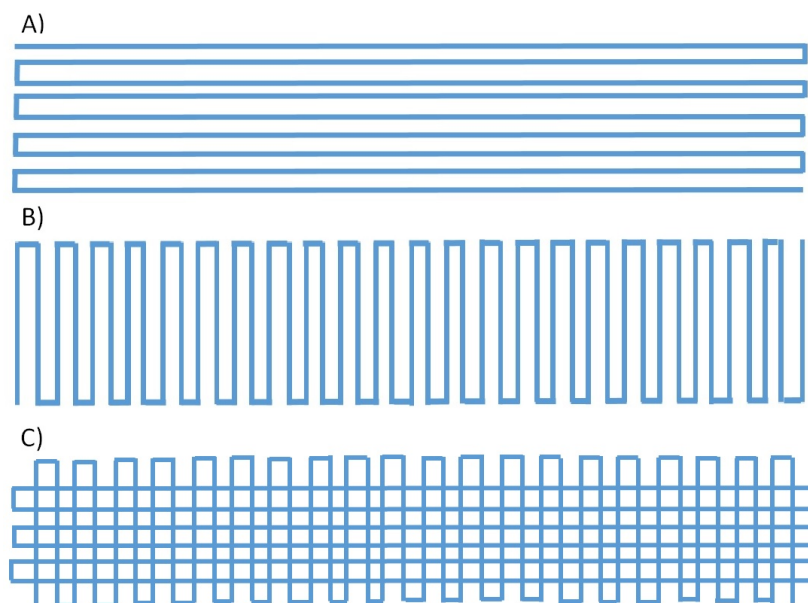
estudo foram efetuadas com recurso a NaOH.

Com o intuito de averiguar a possível solubilidade da CB foram utilizados cinco solventes: dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), tetrahydrofurano (THF), clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) e água. Estes testes foram efetuados à temperatura ambiente e a cerca de 60 °C, não tendo sido observada a solubilização da CB em nenhum dos solventes testados.

### 2.1.3 Preparação de Compósitos com CB

Para a preparação dos compósitos escolheu-se para a matriz a poli( $\epsilon$ caprolactona) (PCL) com o reforço de CB 1,5% (p/p). Neste trabalho foram utilizados dois tipos distintos de PCL fornecidos pela empresa Perstorp: PCL Capa™ 6800 ( $M_n = 80000$  g/mol) e PCL Capa™ 8502A ( $M_n = 50000$  g/mol). Para além do peso molecular, a PCL Capa™ 8502A difere da PCL Capa™ 6800 (Figura 1.3) pois é um co-poliéster de poli( $\epsilon$ -caprolactona) diol (Figura 1.4). Estes polímeros são termoplásticos semi-cristalinos e quando colocados em água a cerca de 40 °C tornam-se moldáveis. Deste modo foi possível efetuar uma pré-mistura dos polímeros com a CB.

Num primeiro conjunto de experiências foram impressos, em duplicado, quatro tipos de materiais no equipamento Bioextruder associado ao Matlab: PCL Capa™ 6800 (PCL 6800), PCL Capa™ 8502A (PCL 8502A), e os compósitos PCL Capa™ 6800 e CB (PCL 6800/CB) e, por fim, PCL Capa™ 8502A e CB (PCL 8502A/CB). Os provetes (dimensões de 40 x 15 x 3 mm) foram impressos longitudinal e transversalmente (Figura 2.1 A e B) aplicando uma voltagem de 13 V, uma velocidade de impressão de 18 mm/s e temperaturas de 70 °C e 80 °C para os materiais que continham PCL 8502A e PCL 6800, respetivamente. Posteriormente foram impressos provetes com porosidade quadrada (lado do poro=0,35 mm) e com as dimensões de 40 x 15 x 2 mm. A velocidade de impressão foi de 20 mm/s, com voltagem de 13 V no caso dos homopolímeros e de 15 V nos compósitos e as temperaturas de 70 °C e de 85 °C, nos provetes com PCL 8502A e PCL 6800, respetivamente. Enquanto que a impressão dos provetes longitudinais e transversais foi contínua, a dos porosos foi realizada por sobreposição de camadas (Figura 2.1 C).



**Figura 2.1:** Esquema da impressão longitudinal (A) e transversal (B) dos provetes contínuos e dos provetes porosos (C).

## 2.2 Técnicas de Caracterização

### 2.2.1 Microscopia Eletrônica de Varrimento

A Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM - do inglês *Scanning Electron Microscopy*) é uma técnica utilizada para se estudar a morfologia da superfície de um material. A superfície é percorrida por um feixe de elétrons acelerados, produzido por um filamento, e focado por um sistema de lentes eletromagnéticas. Da interação entre o feixe de elétrons e a matéria resulta a emissão, entre outros, de elétrons secundários e retrodifundidos, sinais de interesse em SEM. A emissão de elétrons secundários tem origem de uma profundidade de cerca de 30 a 40 nm da superfície, pelo que as imagens obtidas são de interesse para a caracterização morfológica do material em análise [62]. Se o material não for condutor é necessário revesti-lo com uma camada de um material condutor, por exemplo ouro e, nesse caso, perde-se a informação dos elétrons retrodifundidos, sendo recolhido apenas o sinal dos elétrons secundários.

O microscópio de SEM utilizado para a caracterização da celulose foi o da marca Philips, modelo XL30, com filamento de tungstênio, cujo tamanho aparente de fonte é aproximadamente 100 Å. Quanto à caracterização dos compósito foi utilizado o equipamento FEG-SEM (do inglês - *Field Emission Gun*) Merlin-61-50 da

marca Zeiss, com uma corrente de sonda de 90 pA. Antes da sua observação as superfícies dos materiais foram revestidas com uma camada de 20 nm de ouro, através da técnica pulverização catódica.

A Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS - do inglês *Energy-Dispersive X-ray Spectrometry*) está, geralmente, associada ao SEM e permite uma análise semi-quantitativa dos elementos químicos presentes na superfície do material. Os raios X resultantes da interação entre o feixe de uma fonte externa (neste caso uma fonte de eletrões) e a amostra, são detetados por contadores ou detetores de estado sólido. Por detrás da medição da carga dos fotões está o princípio de que os raios X emitidos pela amostra ioniza os átomos presentes no detetor e, a quantidade de carga produzida é diretamente proporcional à energia do fotão que entrou no detetor [62].

O equipamento que permitiu a obtenção dos espectros foi o da marca EDAX, modelo Genesis X4M, o varrimento da superfície teve uma duração de 59 segundos e o feixe eletrónico uma energia de 15 keV.

### 2.2.2 Microscopia de Força Atómica

A Microscopia de Força Atómica (AFM - do inglês *Atomic Force Microscopy*) permite caracterizar a topografia das superfícies à escala nanométrica. O microscópio é constituído por uma ponta fina que varre a superfície e, as forças interatómicas, que variam entre  $10^{-6}$  e  $10^{-9}$  N, são registadas por um fotosensor de posição. Este registo tanto pode ser obtido pela deflexão do braço em balanço (*cantilever*) como pela variação do valor da resistência piezoelétrica. Existem três modos de operação: modo contacto, modo contacto intermitente (*tapping*) e o modo não contacto [63].

O equipamento diInnova, da marca Veeco, foi utilizado em modo contacto intermitente. A sua ponta é de silício (Bruker) com uma frequência de ressonância ( $f_0$ ) de 150 kHz e uma constante de mola ( $k$ ) de  $10 \text{ Nm}^{-1}$ .

### 2.2.3 Microscopia de Foco Infinito

Através da técnica de Microscopia de Foco Infinito (IFM - do inglês *Infinite Focus Microscopy*) é possível estudar a rugosidade de superfícies com grandes profundidade de campo e de campo de visão. A resolução vertical é de cerca 10 nm e a lateral de 400 nm.

O microscópio utilizado é da marca Alicona Imaging GmbH, modelo InfiniteFocus Teslastraße 8.

### 2.2.4 Difração de raios X

A Difração de raios X (XRD - do inglês *X-ray Diffraction*) é uma técnica de caracterização estrutural. Um feixe colimado de raios X incide sobre o material e, se certas condições forem satisfeitas, sofre difração. Com efeito, se a interferência entre os feixes difratados por dois planos atômicos, adjacentes e paralelos, for construtiva, verifica-se a Lei de Bragg (eq. 2.1)

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (2.1)$$

onde  $n$  é a ordem de reflexão (número inteiro),  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação incidente,  $d$  a distância interplanar e  $\theta$  o ângulo de incidência dos raios X [8].

Neste estudo foi utilizado, para caracterização da CB, o equipamento de microdifração X'Pert, da Panalytical, com alvo de Cobre ( $\lambda_{K_{\alpha}}=0,15418\text{nm}$ ), com uma tensão de 45 kV, uma corrente de 40 mA, uma gama de varrimento de 10 a 60°, com um passo de 0,03° e um tempo de 1 s/passos. Para a caracterização dos compósitos foi utilizado o equipamento X'Pert, Phyllips, com alvo de Cobalto ( $\lambda_{K_{\alpha 1}}=0,178901\text{nm}$ ), com uma tensão de 40 kV, uma corrente de 35 mA, uma gama de 10 a 50°, com um passo de 0,025° e um tempo de 1 s/passos.

### 2.2.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR - do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) é uma espectroscopia do tipo vibracional, que permite estudar não só a estrutura molecular do material como também o ambiente molecular [64]. O material é irradiado por uma fonte de radiação na região do infravermelho e, se houver uma alteração no momento dipolar da molécula durante a sua vibração, o modo normal de vibração é ativo no infravermelho. Cada tipo específico de ligação covalente absorve energia para valores bem definidos de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ), correspondentes a vibrações fundamentais dos grupos funcionais. Na região de infravermelho médio (4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ ) observam-se dois

tipos principais de vibrações: aquelas que ocorrem ao longo das ligações químicas, resultando numa alteração do comprimento da ligação - vibrações de alongação (*stretching*) que podem ser simétricas ou assimétricas - e as vibrações que envolvem alteração nos ângulos da ligação, denominadas por vibrações de flexão (*bending*). As últimas podem ser subdivididas em vibrações no plano ( $\delta$ ) - do tipo tesoura (*scissoring*) ou balanço (*rocking*) - ou fora do plano ( $\gamma$ ) - do tipo torção (*twisting*) ou oscilação (*wagging*). Cada grupo funcional tem, assim, bandas de frequência vibracional específicas que dependem da natureza das ligações químicas, das interações com o ambiente e das massas relativas dos átomos envolvidos na vibração [65].

Foi utilizado o espectrómetro da marca Perkin Elmer, modelo Frontier (FT-NIR/MIR) equipado com um detetor FR-DTGS e um divisor de feixe de KBr. O registo dos espectros foi efetuado com resolução  $4.0 \text{ cm}^{-1}$  com 16 acumulações e recorrendo à técnica de amostragem não destrutiva de refletância total atenuada (ATR).

### 2.2.6 Espectroscopia do Foleletrão X

A Espectroscopia do Foleletrão X (XPS - do inglês *X-rays Photoelectron Spectroscopy*) permite não só identificar os elementos químicos presentes numa amostra, bem como o seu estado químico. Uma fonte de raios X ao incidir sobre a superfície excita os seus eletrões, segundo o efeito fotoelétrico, sendo estes emitidos e avaliados pela sua energia cinética ( $E_k$ ) num analisador eletrostático. Quando se conhecem a função trabalho ( $\phi$ ), correspondente a um valor específico regulado pelo equipamento, a energia do fóton do feixe de raios X incidente ( $\nu$ ) e a energia cinética do fotoeletão ejetado, é possível determinar a energia de ligação característica do eletrão da amostra ( $E_b$ ) através da eq. 2.2:

$$E_b = h\nu - E_k + \phi \quad (2.2)$$

onde  $h$  é a constante de Planck. Desta forma, a técnica permite uma análise quantitativa da composição química de um material, uma vez que as energias dos eletrões dos átomos são características para cada elemento e refletem o ambiente eletrónico envolvente [66].

Neste estudo foi utilizado o equipamento da marca Kratos, modelo Axis Ultra HSA, cuja fonte de raios X é de alumínio ( $\lambda = 8 \text{ \AA}$ ) e uma potência de 15 kV (90 W). O modelo de cálculo para a composição pressupõe que a amostra é plana e homogénea

em superfície e espessura na região analisada e utiliza os fatores de sensibilidade - RSF - disponíveis para o AXIS Ultra HSA. A carga da correlação foi de 2,77 eV e foi referenciado o C1s, de energia 285 eV.

### 2.2.7 Ressonância Magnética Nuclear

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN ou NMR - do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*) torna possível a obtenção de espectros de alta resolução das ressonâncias associadas a vários elementos, nomeadamente  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Esta técnica tem por base as propriedades magnéticas dos núcleos atômicos. A interação do momento magnético nuclear com um campo magnético externo,  $B_0$ , resulta num diagrama de nível de energia nuclear, de acordo com as regras de mecânica quântica, uma vez que a energia magnética do núcleo é restrita a certos valores discretos, os *eigenvalues*. Estes estão, por sua vez, associados a *eigenstates* ou estados estacionários correspondentes aos únicos estados nos quais um elemento pode existir. Quando uma amostra é submetida a um pulso de radiofrequência (RF), se os seus núcleos magnéticos estiverem em ressonância, um detetor de RF registrará a intensidade do sinal eletromagnético emitido em função da frequência, ou seja, um espectro de RMN. Estes espectros podem então ser realizados apenas para moléculas cujos momentos magnéticos atômicos são diferentes de zero, como é o caso do  $^1\text{H}$  e  $^{19}\text{F}$ . Átomos que têm número atômico igual à massa, caso do  $^{12}\text{C}$ , não têm momento magnético. Por essa razão os estudos de RNN do carbono são limitados ao isótopo estável  $^{13}\text{C}$ , cuja abundância natural é de apenas 1,1 % [67].

Para a caracterização do RMN  $^1\text{H}$  da celulose bacteriana, esta foi dissolvida em DMSO e depois analisada segundo o espectrómetro Bruker Avance III, com campo magnético de 400 MHz e uma sonda de detecção de ressonância tripla TIX de 5 mm. Para a caracterização do RMN  $^{13}\text{C}$  foi utilizado o equipamento Bruker Avance III (9.4 T), com um campo magnético de 12 kHz e uma sonda de detecção de 4 mm.

### 2.2.8 Calorimetria Diferencial de Varrimento e Análise Termogravimétrica

A Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC - do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) mede a diferença de temperatura de um material em relação a um material de referência, com o aumento da temperatura. Essa variação está in-



timamente relacionada com uma diferença de fluxo de calor pelo que é possível determinar as transições que ocorrem na amostra e as temperaturas a elas associadas, nomeadamente a temperatura de fusão ( $T_f$ ) e a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) [68, 69].

Neste estudo foi utilizado um equipamento da marca TA Instruments, modelo SDT Q600. A análise foi efetuada em atmosfera de azoto, a  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  desde  $25^\circ\text{C}$  a  $200^\circ\text{C}$ , e a quatro frequências de 1, 2, 5 e 10 Hz. O equipamento regista, simultaneamente, as diferenças de fluxo de calor, bem como as variações de massa, o que permite a análise termogravimétrica (TGA - do inglês *Thermogravimetric Analysis*).

### 2.2.9 Análise Termo Mecânica Dinâmica

A técnica Análise Termo Mecânica Dinâmica (DMTA - do inglês *Dynamic Mechanical Thermal Analysis*) consiste na aplicação de uma força e na medição do deslocamento originado. Ao efetuar o ensaio com variação de temperatura é possível estudar o comportamento viscoelástico do material: o módulo de armazenamento ( $E'$  - *storage modulus*) fornece informações relativamente à resposta elástica e o módulo de perda ( $E''$  - *loss modulus*) à resposta viscosa. O fator de amortecimento  $\tan\delta$  é obtido através da eq. 2.3 [69]:

$$\tan\delta = \frac{E''}{E'} \quad (2.3)$$

Para além das transições térmicas associadas à temperatura de fusão ( $T_f$ ) e à temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), também denominada de alfa ( $T_\alpha$ ), é possível identificar outro tipo de transições como a beta ( $T_\beta$ ) ou gama ( $T_\gamma$ ) [70].

A análise termomecânica foi realizada no equipamento DMA 242D da marca Netzch (Germany). As amostras foram analisadas em tensão, no modo multifrequência (1, 2, 5, 10 Hz), num intervalo de temperatura entre  $-150^\circ\text{C}$  e  $50^\circ\text{C}$ , a  $2^\circ\text{C}/\text{min}$ .

### 2.2.10 Molhabilidade

Quando uma gota de água é deixada cair sobre uma superfície sólida, forma-se uma interface tripla entre o sólido, líquido e vapor. O ângulo de contacto corresponde ao ângulo formado entre a superfície sólida e a tangente da superfície da gota. A equação que descreve o comportamento das tensões responsáveis pelo equilíbrio numa superfície ideal é a equação de Young (eq. 2.4):

$$\gamma_{lv}\cos\theta = \gamma_{sv} - \gamma_{sl} \quad (2.4)$$

onde  $\gamma_{lv}$ ,  $\gamma_{sv}$  e  $\gamma_{sl}$  representam as tensões interfaciais líquido-vapor, sólido-vapor e sólido-líquido, respetivamente e  $\theta$  o ângulo de contacto estático [71]. Este parâmetro permite aferir o grau de molhabilidade de uma superfície sendo que, para valores de  $\theta$  inferiores a 65 °C a superfície é dita hidrófila, superiores a 65 °C hidrófoba e, superiores a 150 °C superhidrófoba, não havendo praticamente contacto entre a gota e a superfície ("efeito de lótus") [72].

O equipamento modelo OCA20 da marca DataPhysics Instruments GmbH foi o utilizado para a medição do contacto sólido estático, com uma gota de água desionizada e destilada de 5  $\mu$ L. Foram efetuadas seis medições nas membranas dos dois tipos de PCL e compósitos, e apenas duas medições na membrana da CB.

### 2.2.11 Propriedades mecânicas

#### a) Ensaio de Tração Uniaxial

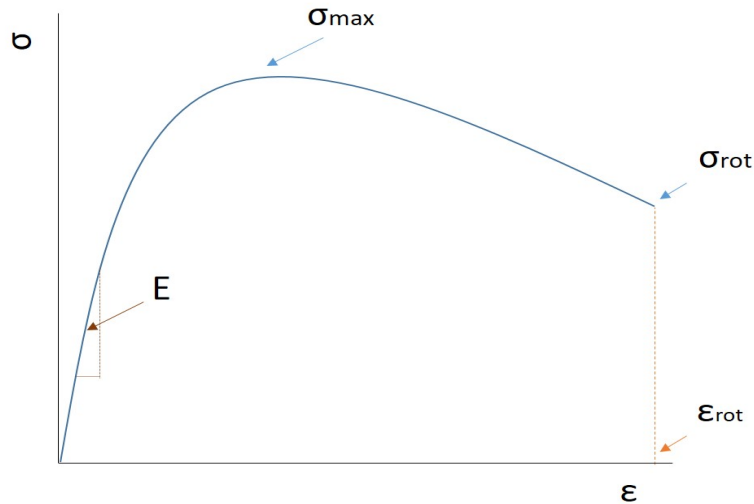
Num Ensaio de Tração Uniaxial um provete é submetido a uma força de tração uniaxial crescente, registando-se a variação do comprimento ( $\Delta L$ ) em função da carga aplicada ( $F$ ). Para se obter resultados apenas dependentes do material e não das dimensões do corpo de prova, traça-se uma curva tensão ( $\sigma$ , com  $\sigma=F/A$ ) em função da deformação ( $\epsilon=\Delta L/L_0$ ). Para uma melhor compreensão, as propriedades mecânicas, avaliadas no ensaio de tração, estão ilustradas na Figura 2.2. Na região de deformação elástica (zona linear do gráfico) é possível determinar o módulo de elasticidade ou de Young ( $E$ ) através da lei de Hooke (eq. 2.5), intimamente relacionado com a rigidez do material [8].

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} \quad (2.5)$$

A deformação ( $\epsilon$ ) traduz a capacidade de um material se deformar plasticamente, até à sua rotura, e pode ser calculado através do alongamento percentual (eq. 2.6).

$$\epsilon_{rot} = \frac{\Delta L}{L_0} \times 100\% \quad (2.6)$$

A resistência à tração ( $\sigma_{max}$ ) é o valor máximo de tensão que pode ser, ou não, a tensão de rotura do material ( $\sigma_{rot}$ ).



**Figura 2.2:** Resumo das propriedades mecânicas, a partir de uma curva tensão-deformação.

O equipamento Autograph AG-X da marca SHIMADZU foi o utilizado. Este permite aplicar uma força máxima de 5 kN. O *software* utilizado na seleção dos parâmetros e recolha dos dados foi o Trapezium X, a uma taxa de deslocamento de 10 mm/min. As propriedades flexurais foram calculadas segundo a norma ASTM-D638.

### b) Ensaio de Flexão

O Ensaio de Flexão em 3 pontos consiste em efetuar uma deformação na direção perpendicular à da força atuante, sendo registada a força aplicada ( $F$ ) em função do deslocamento ( $\Delta L$ ). As propriedades flexurais foram calculadas de acordo com a norma ASTM-D-790-02, correspondentes à tensão de flexão ( $\sigma$ ) (eq. 2.7) e ao módulo de rigidez à flexão (ou módulo de Young,  $E$ ) (eq. 2.8), na zona elástica [73].

$$\sigma = \frac{3PL}{2bh^2} \quad (2.7)$$

onde  $P$  é a carga máxima,  $L$  o comprimento de span,  $b$  a largura do provete e  $h$  a sua espessura.

$$E = \frac{\Delta PL^3}{48\Delta uI} \quad (2.8)$$

em que  $\Delta P$  é o intervalo de carga aplicada,  $\Delta u$  a variação do deslocamento de flexão a meio do span e  $I$  o momento de inércia da secção transversal, correspondente a

$$I = \frac{bh^3}{12} \quad (2.9)$$

O equipamento de ensaio foi o universal Autograph AG-X da marca SHIMADZU, cuja força máxima aplicada é de 5 kN. O *software* utilizado foi o Trapezium X. Segundo a norma, a velocidade de avanço seria de 1 mm/min mas, por se tratar de um material polimérico de maleabilidade elevada, a taxa de deslocamento foi aumentada para 5 mm/min e o deslocamento máximo permitido de 10 mm.

### c) Nanoindentação

De modo a avaliar as propriedades mecânicas apenas da CB foram efetuados ensaios de nanoindentação. Este é um teste em que se mede a profundidade a que um indentador penetra no material aquando da aplicação de uma carga. Os ensaios são efetuados em ciclos de carga-manutenção-descarga e avaliam a capacidade do material resistir através da medição da profundidade da indentação. A partir do valor da profundidade é possível determinar o valor da dureza ( $H_v$ ) e do módulo de elasticidade (E).

Neste estudo foi utilizado um equipamento da marca MicroMaterials, modelo NanoTest Plataforma. As avaliações foram efetuadas com carga de 1 mN e as velocidades de carga e descarga foram de 0.17 mN/s. O tempo de manutenção à carga máxima foi de 30 segundos e também de 30 segundos para correção dp *thermal drift* que corresponde a 10% da carga máxima na descarga.

### 2.3 Testes *in vitro*

A capacidade de absorção e de degradação dos quatro tipos de provetes porosos foi avaliada através dos testes *in vitro*. Cada amostra foi imersa em 4 mL de fluido corporal simulado (SBF - do inglês *Simulated Body Fluid*). Os tubos de *Falcon* foram colocados num termoagitador a uma temperatura constante de 37 °C, a uma velocidade de rotação de 100 rpm. No final de cada semana os materiais foram retirados e pesados, de modo a ser avaliado o grau de inchaço (eq. 2.10)

$$\% \text{ absorção} = \frac{m_{f,molhado} - m_i}{m_i} \times 100\% \quad (2.10)$$

onde  $m_i$  corresponde ao peso inicial do provete e  $m_{f,molhado}$  àquele depois de retirado do tubo e, por isso, molhado.

Depois de secos os provetes foram novamente pesados, para se avaliar a sua degradação (eq. 2.11).

$$\% \text{ degradação} = \frac{m_{f,seco} - m_i}{m_i} \times 100\% \quad (2.11)$$

em que  $m_i$  corresponde ao peso inicial do provete e  $m_{f,seco}$  àquele depois de ter secado. Cada ensaio foi efetuado em duplicado.

A solução de SBF simula apenas a parte inorgânica do plasma humano sanguíneo e, portanto, não contém células, proteínas, glucose, vitaminas, hormonas, etc (Tabela 2.1) [74].

**Tabela 2.1:** Composição iônica da solução SBF.

Ião	Concentração (mmol/L)
Na <sup>+</sup>	142,0
K <sup>+</sup>	6,5
Mg <sup>2+</sup>	1,5
Ca <sup>2+</sup>	2,5
Cl <sup>-</sup>	148,0
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4,2
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0

# 3

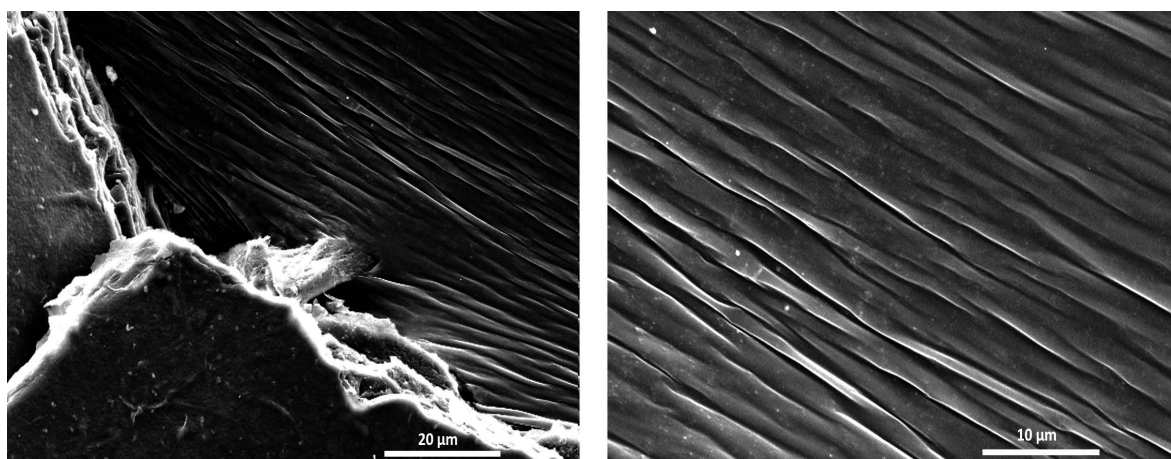
## Resultados e Discussão

Em primeiro lugar serão apresentados alguns resultados da caracterização da CB. Os restantes resultados são apresentados conjuntamente com os compósitos de modo a tornar a discussão mais clara.

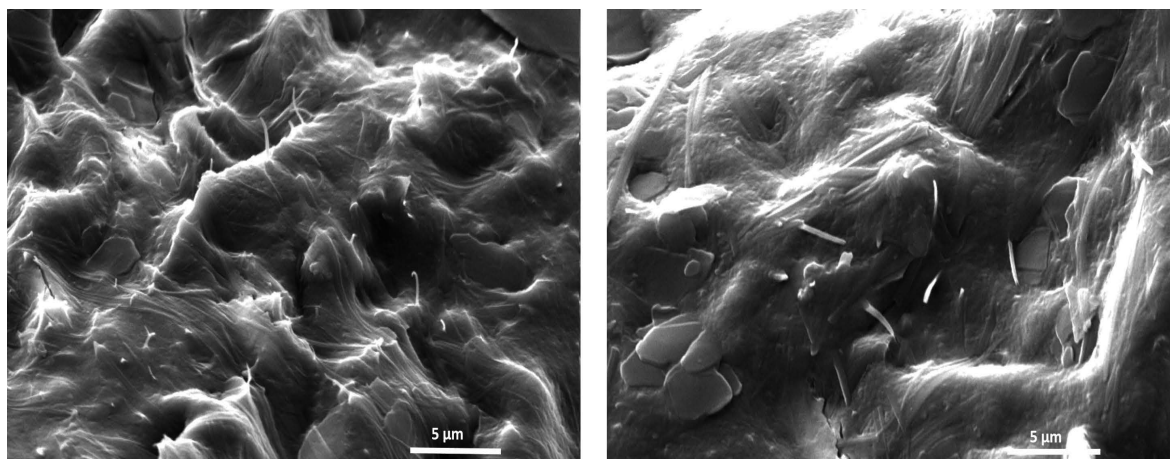
### 3.1 Caracterização da CB

#### 3.1.1 Morfologia/Topografia

A morfologia da superfície da CB foi avaliada por SEM. Nas Figuras 3.1 e 3.2 não são observadas bactérias, indicando que o método de lavagem foi eficaz. As fibras estão bem definidas e dispersas homogeneamente de forma paralela. No entanto, nas superfícies de evaporação, a superfície apresenta uma morfologia não fibrosa em que as fibras da celulose são visíveis de uma forma mais desordenada.

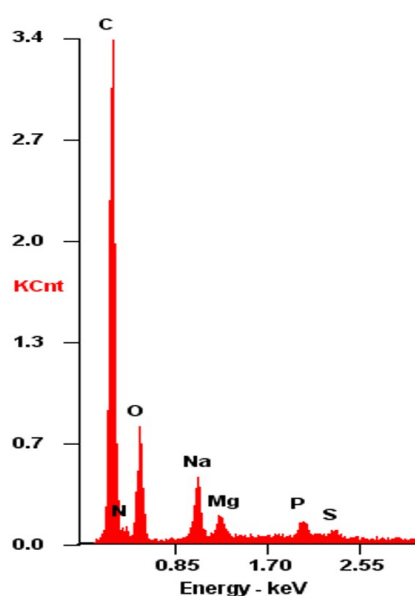


**Figura 3.1:** Morfologia da superfície da CB numa zona de fratura.



**Figura 3.2:** Morfologia da superfície da CB (superfície de secagem).

Os elementos químicos presentes na superfície da matriz extracelular polimérica foram identificados por EDS (Figura 3.3).



**Figura 3.3:** Espectro de EDS da CB.

O pico de maior intensidade é o do elemento de carbono (C), seguindo-se o de oxigénio (O), tal como era expectável. A presença de sódio (Na), magnésio (Mg), azoto (N), potássio (P) e enxofre (S) sugere a troca de grupos da CB por outros presentes na matriz extracelular. O pico de sódio pode ainda estar relacionado com a metodologia de extração da CB. Não obstante ter sido realizado um passo final de lavagem com água, vestígios de NaOH podem ter permanecido no material.

A análise da topografia da CB foi realizada por AFM. Na Figura 3.4 (A) é



observada uma elevada densidade de nanofibras dispersas pela superfície e em (B) o seu emaranhamento. As fibrilas apresentam comprimento micrométrico e o seu diâmetro médio (C) corresponde a  $33.3 \pm 13.3$  nm, o que permite afirmar que a estrutura fibrilar tridimensional consiste em nanofibras de celulose denominadas por "nanocelulose", de acordo com a literatura [26, 30, 39, 75, 76].

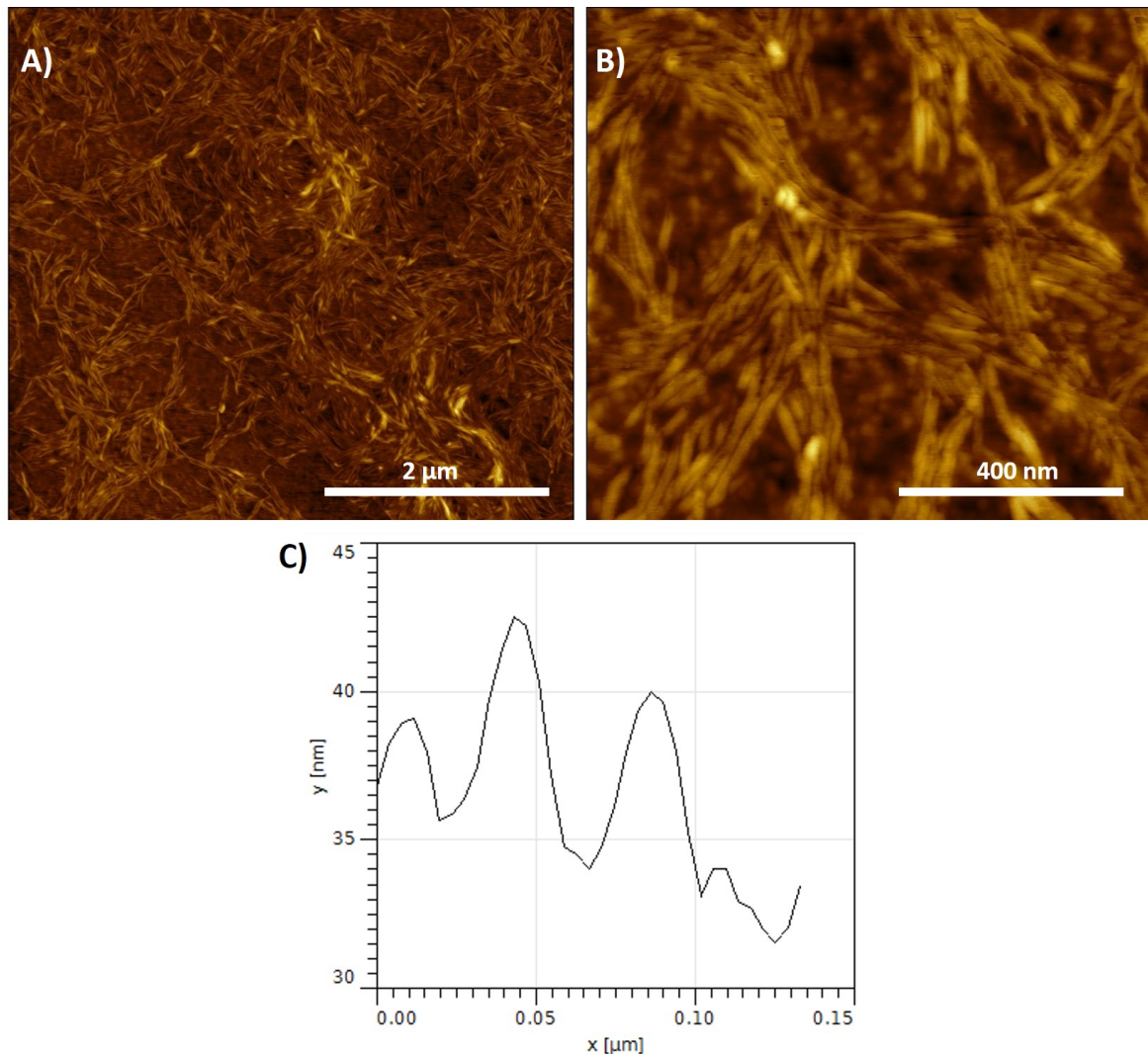
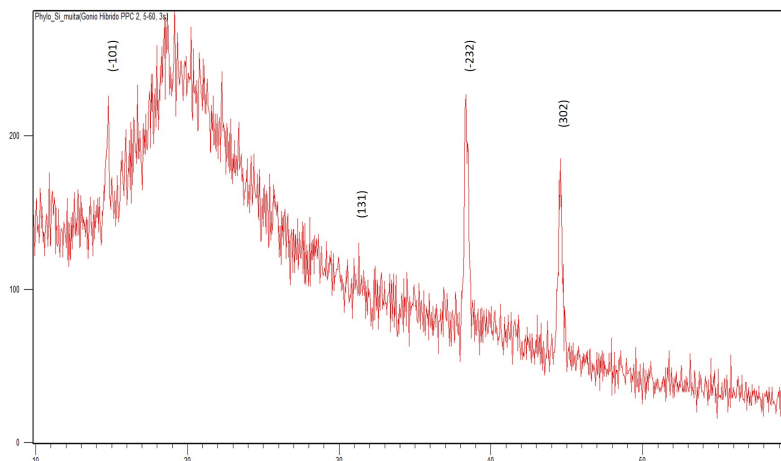


Figura 3.4: Imagens topográficas AFM da CB (A e B) e exemplo do perfil 2D (C).

### 3.1.2 Análise estrutural

A análise estrutural da CB foi avaliada por XRD. O difratograma apresenta picos de difração a  $2\theta = 14,9^\circ$ ,  $2\theta = 31,2^\circ$ ,  $2\theta = 38,6^\circ$  e  $2\theta = 44,4^\circ$ , atribuídos, de acordo com a ficha ICDD nº 03-0289 da celulose nativa, aos planos de difração  $(\bar{1}01)$ ,  $(131)$ ,  $(\bar{2}32)$  e  $(302)$ , respetivamente (Figura 3.5). Segundo a literatura, a celulose nativa  $I_\alpha$  apresenta três picos bem definidos em  $2\theta = 14,5^\circ$ ,  $2\theta = 16,9^\circ$  e

$2\theta = 22,6^\circ$ , correspondentes aos planos cristalográficos (100), (010) e (110), respectivamente, quando utilizado um alvo de Cobre ( $\lambda K_\alpha = 0,15406$  nm) [47].



**Figura 3.5:** Difratograma da CB

De acordo com a ficha ICDD da celulose nativa, a CB é maioritariamente constituída pela celulose  $I_\alpha$ . Para além dos picos existe uma "bossa" que remete para uma parte amorfa. Isto acontece porque a CB é semicristalina, ou seja, é constituída tanto por domínios cristalinos como amorfos [21].

#### 3.1.3 Análise química

A análise química da CB foi realizada por XPS, RMN e FTIR. Nesta secção serão tratados os resultados obtidos pelas duas primeiras técnicas e, os resultados de FTIR são avaliados em conjunto com os dos compósitos.

A análise de XPS permitiu não só identificar os elementos químicos presentes na superfície da CB como também o seu estado químico. As regiões de interesse dos elementos maioritariamente presentes na CB estão representadas nas Figuras 3.6, 3.7 e 3.8. A análise ponderal com base nas regiões de interesse e normalizada para 100% está na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1:** Composição química da CB.

Elemento	Percentagem atômica (% at.)
C	80,7
O	15,9
N	3,4

Os espectros de alta resolução destes elementos, após desconvolução, permitem avaliar as ligações químicas em que cada elemento está envolvido. No caso do carbono (Figura 3.6), as ligações predominantes são C-C e C-H, bem como vários tipos de ligação ao oxigênio. Por sua vez, este elemento (Figura 3.7) apresenta maioritariamente as ligações do tipo C-OH. O azoto (Figura 3.8), que representa apenas cerca de 3,4% at. da composição química da CB, encontra-se maioritariamente em ligações N-H e, em menor % at., em ligações C-N.

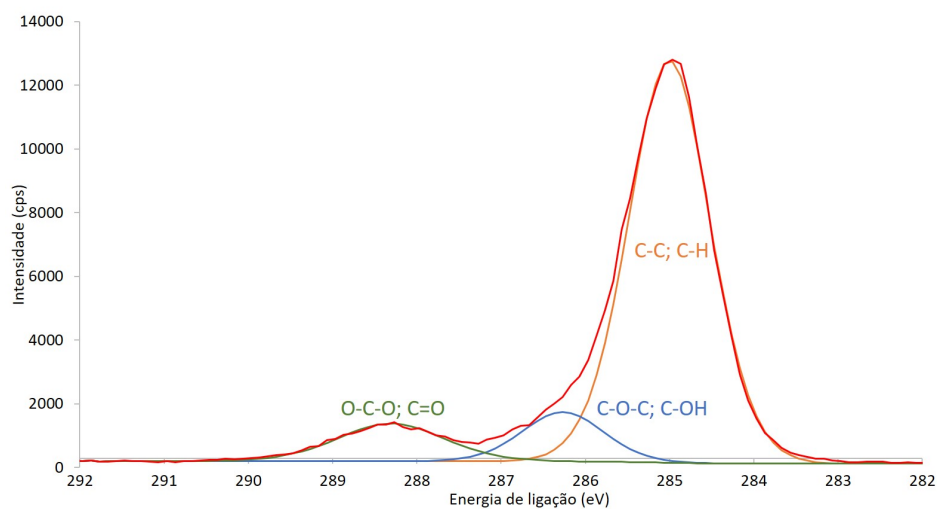


Figura 3.6: Região de interesse do C1s.

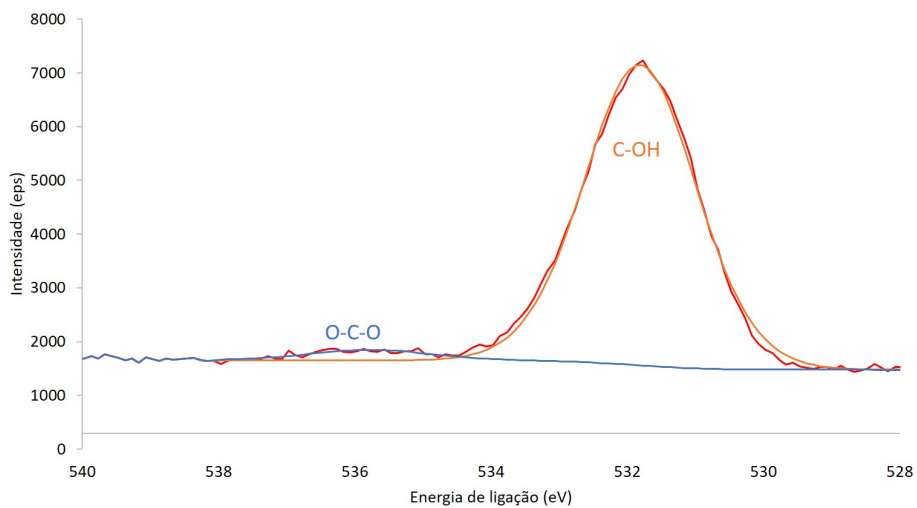


Figura 3.7: Região de interesse do O1s.

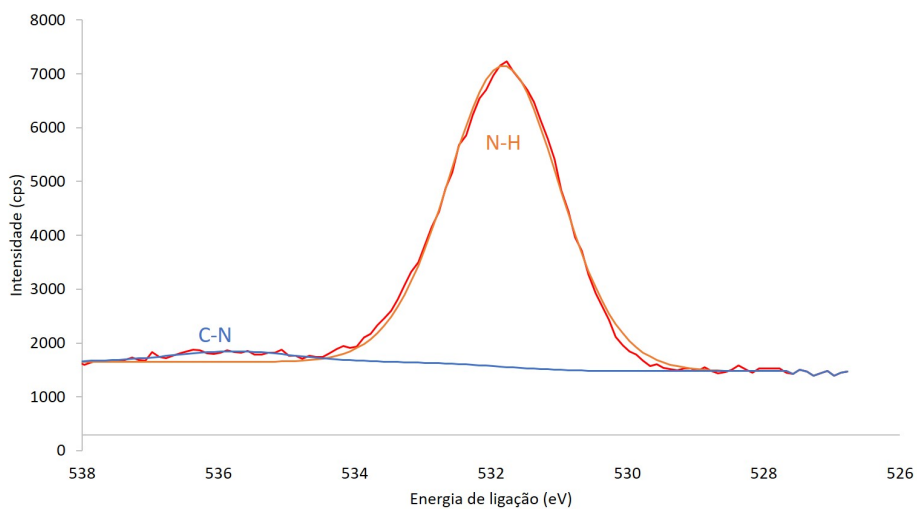
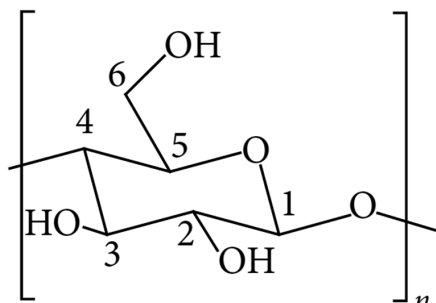


Figura 3.8: Região de interesse do N1s.

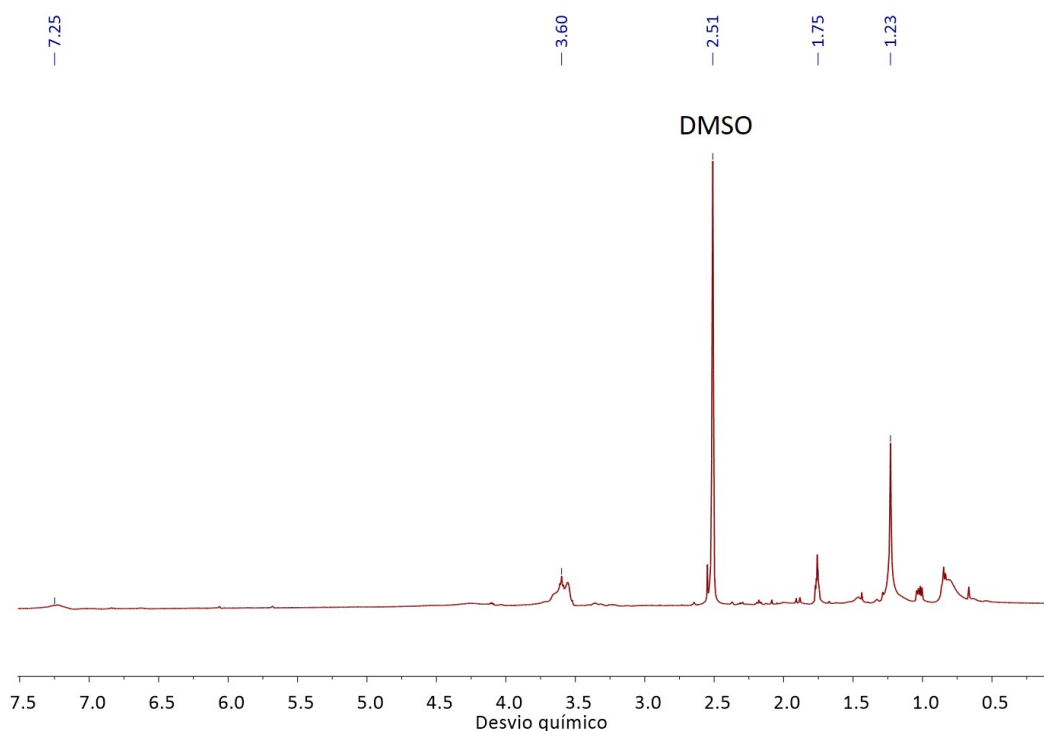
Relembrando a estrutura da celulose (Figura 3.9) as ligações químicas identificadas por XPS são as que seriam expectáveis exceto as ligações do azoto, cuja presença será, mais à frente, discutida.



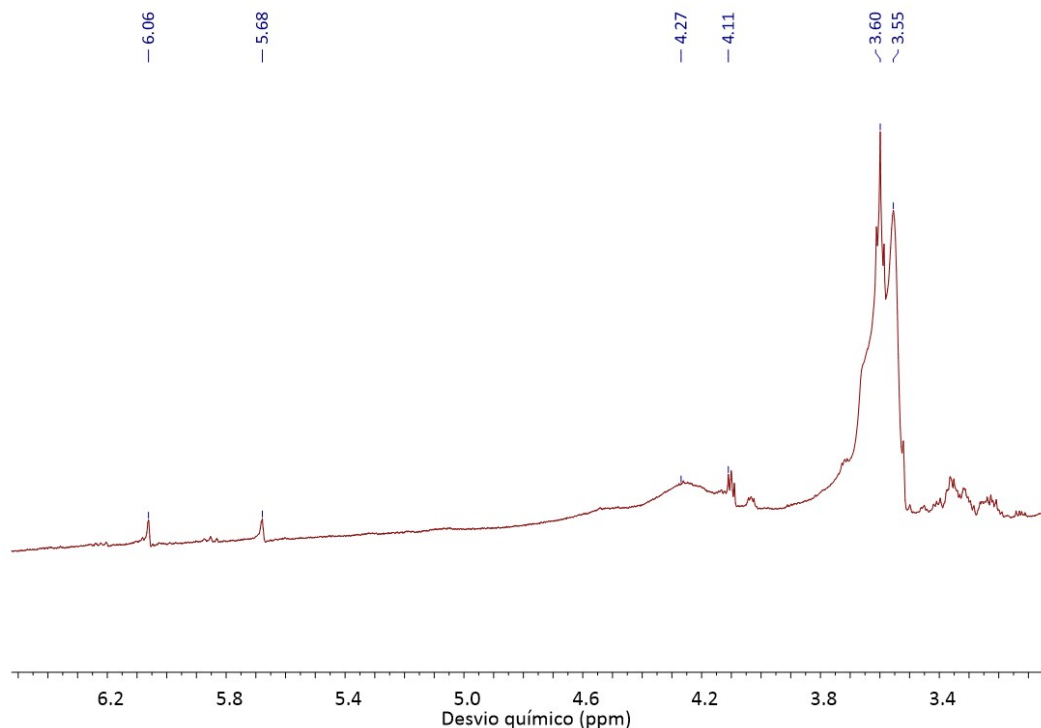
**Figura 3.9:** Estrutura molecular da celulose, adaptado de [20].

Quanto à técnica de RMN foram estudados, em primeiro lugar, os desvios químicos associados ao protão de hidrogénio ( $^1\text{H}$ ) e, em segundo lugar, ao carbono  $^{13}\text{C}$ .

O espectro de  $^1\text{H}$  RMN está representado na Figura 3.10, onde é observado o pico do solvente utilizado (DMSO) e a região que compreende os 3 ppm e 6 ppm é atribuída ao anel da CB, de acordo com os espectros de celulose reportados na literatura [77, 78] (Figura 3.11).



**Figura 3.10:** Espectro completo de  $^1\text{H}$  RMN da CB.



**Figura 3.11:** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do anel da CB.

Por comparação do espectro de  $^1\text{H}$  RMN da CB com o da celulose reportado na literatura [77, 78], apenas são observadas algumas semelhanças. A diferença na intensidade dos picos poderá estar relacionada com a alteração de grupos como, por exemplo, substituição dos grupos  $-\text{OH}$  por outros grupos químicos. Quando produzida pelas bactérias, a CB ao ser extrudida pode ficar ancorada em alguns grupos  $-\text{NH}_2$  das proteínas transmembranares, o que pode explicar a presença dos picos associados ao  $-\text{NH}_2$  (pico a 7,25 ppm) [79].

O espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN foi efetuado de modo a esclarecer algumas das dúvidas levantadas pela análise RMN do próton. O espectro geral encontra-se na Figura 3.12, e os desvios químicos associados aos átomos de carbono destacados na Figura 3.13 estão referenciados na Tabela 3.2. Os núcleos de C4 e C6 apresentam duas linhas de ressonância, uma de campo baixo e outra de campo alto, referidas como C4D/C4U e C6D/U (D do inglês *downfield* e U do inglês *upfield*), respectivamente. Enquanto que C4D e C6D são atribuídas às componentes cristalinas, C4U e C6U estão relacionadas com as componentes desordenadas [80, 81].

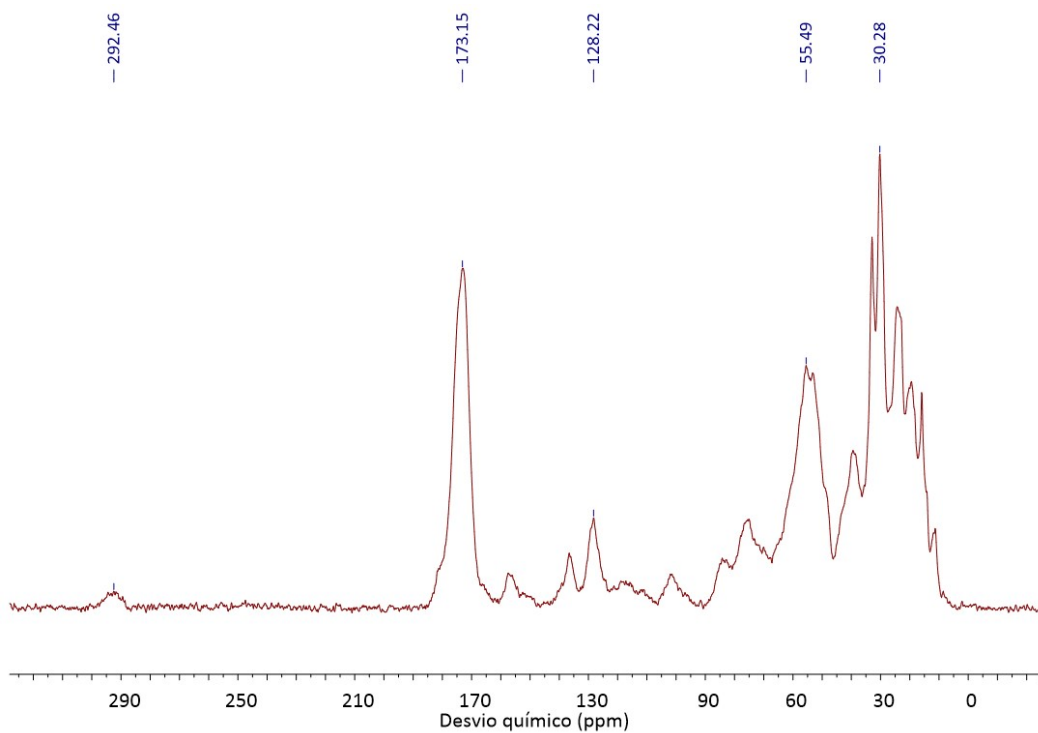


Figura 3.12: Espectro geral de  $^{13}\text{C}$  RMN da CB.

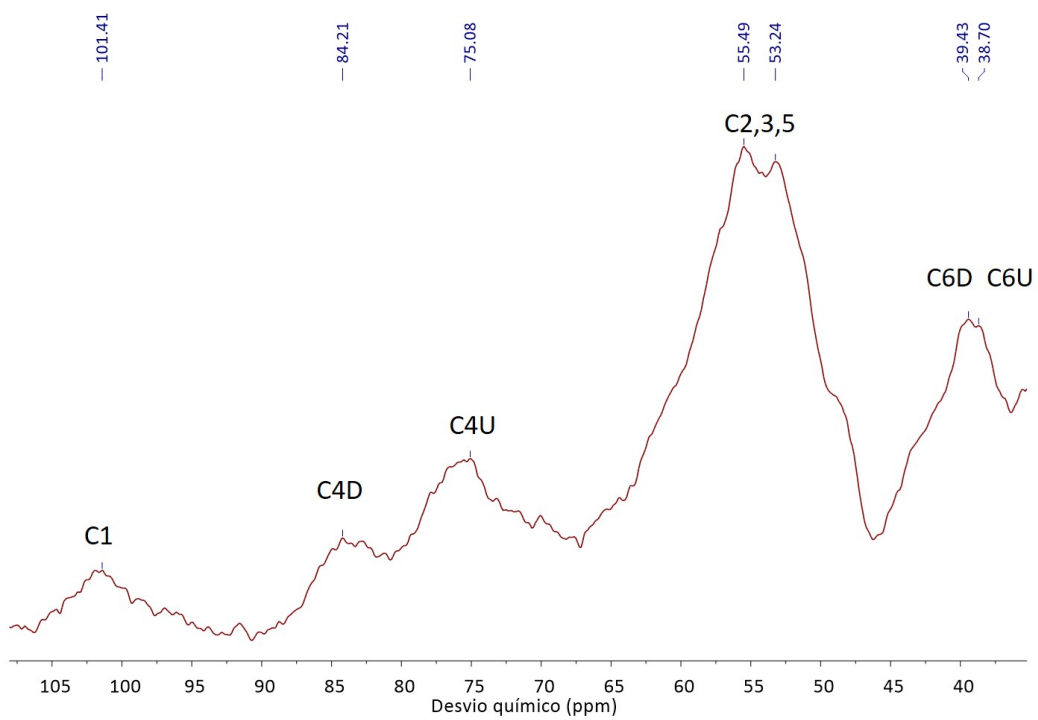


Figura 3.13: Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN da CB.

**Tabela 3.2:** Desvios químicos do espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN da CB.

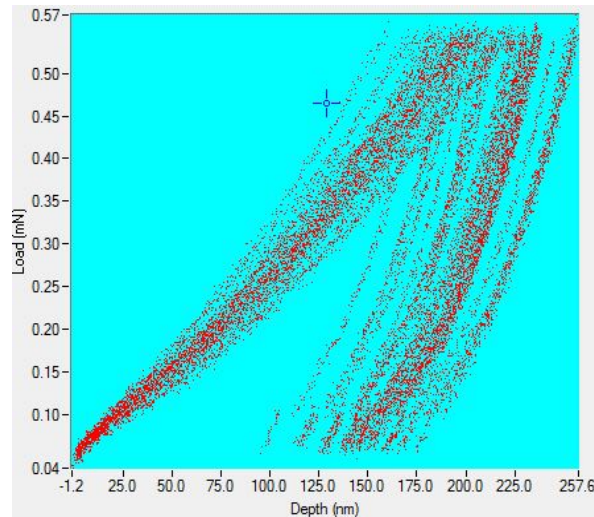
Carbono	$\delta$ (ppm)	Referência
C1	101	[28]
C4D	84	[82]
C4U	75	[83]
C2, 3, 5	55/53	-
C6D	39	-
C6U	39	-

O pico de C1 é atribuído à linha de ressonância de 101 ppm, os átomos de carbono C2, C3 e C5 estão sobrepostos no conjunto de ressonâncias 50-55 ppm, os dois picos de C4 estão num intervalo entre 75-84 ppm e os de C6 entre 38-39 ppm (Figura 3.13). Os desvios químicos dos átomos de carbono 2, 3, 5 e 6 do anel da CB são relativamente diferentes dos reportados na literatura. Apesar do espectro ser semelhante, os seis átomos de carbono estão na região entre 40 e 105 ppm quando, de acordo com a literatura [80, 82, 83, 84], deveriam estar na região entre 60 e 110 ppm. O pico do C4D da região cristalina é, neste caso, de menor intensidade que o de C4U da região amorfa, ao contrário do encontrado na literatura [80, 82]. No entanto, deve, mais uma vez, ser referido que as caracterizações da CB reportadas na literatura não se referem nunca à CB produzida por *P. myrsinacearum*.

### 3.1.4 Propriedades mecânicas

A dureza ( $H_V$ ) e módulo de elasticidade (E) da CB foram determinadas através do ensaio de nanoindentação (Figura 3.14).





**Figura 3.14:** Curva da carga e descarga do ensaio de nanoindentação da CB.

A análise da curva carga-profundidade mostra que a profundidade máxima foi, aproximadamente, de 260 nm. Os valores da  $H_v$  e do  $E$  foram de  $(486 \pm 96)$  MPa e  $(7,1 \pm 1,1)$  GPa, respectivamente. O valor de  $H_v$  é superior ao intervalo de valores reportado na literatura (entre 19 e 39 MPa, para uma carga de 0,4 mN), o que indica que a CB é resistente ao indentador [85]. O valor de  $E$  depende do material, ou seja, das condições de tratamento e da microestrutura [30, 85]. Segundo a literatura, o valor de  $E$  da CB varia entre 198 e 659 MPa, da nanocelulose derivada de plantas varia entre 11,95 e 18,22 GPa e a dos nanocristais de celulose entre 18 e 50 GPa [85, 30, 75].

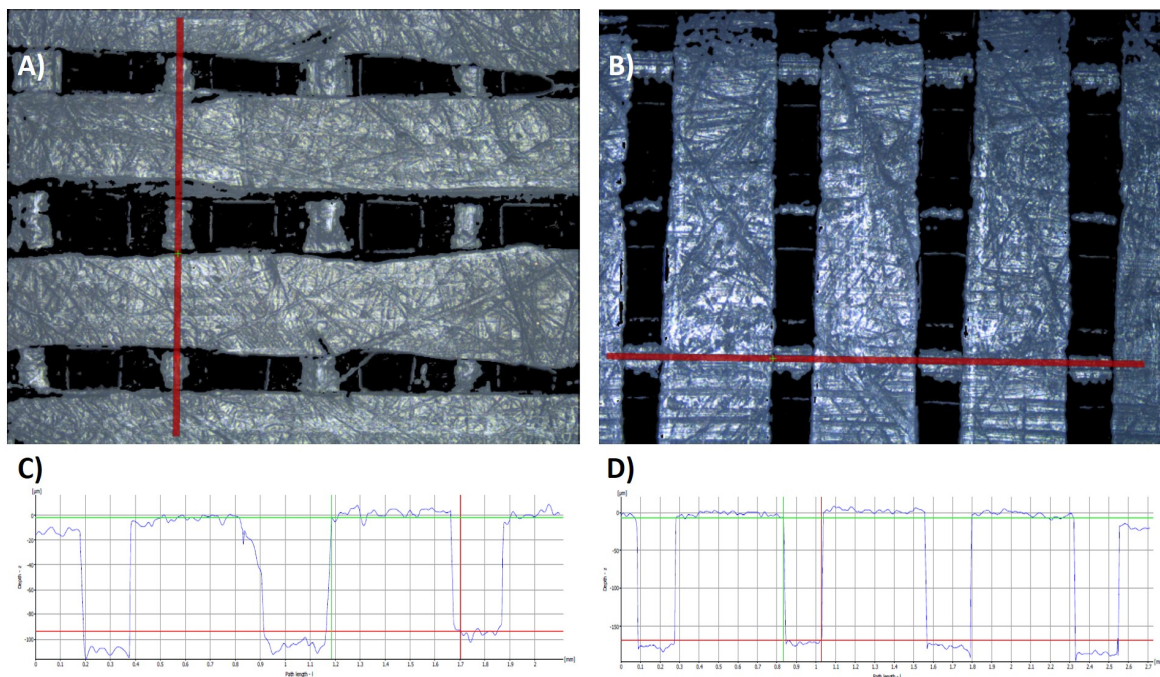
A caracterização por nanoindentação demonstra que as propriedades mecânicas da CB produzida por *P. myrsinacearum* são superiores às reportadas na literatura para a CB produzida por outras estirpes de bactérias.

## 3.2 Caracterização dos compósitos

Num primeiro conjunto de experiências foram impressos provetes longitudinais (L) e transversais (T) de PCL 6800, PCL 8502A e respectivos compósitos (PCL 6800/CB e PCL 8502A/CB). Posteriormente foram impressos provetes do mesmo material mas com porosidade quadrada.

### 3.2.1 Topografia

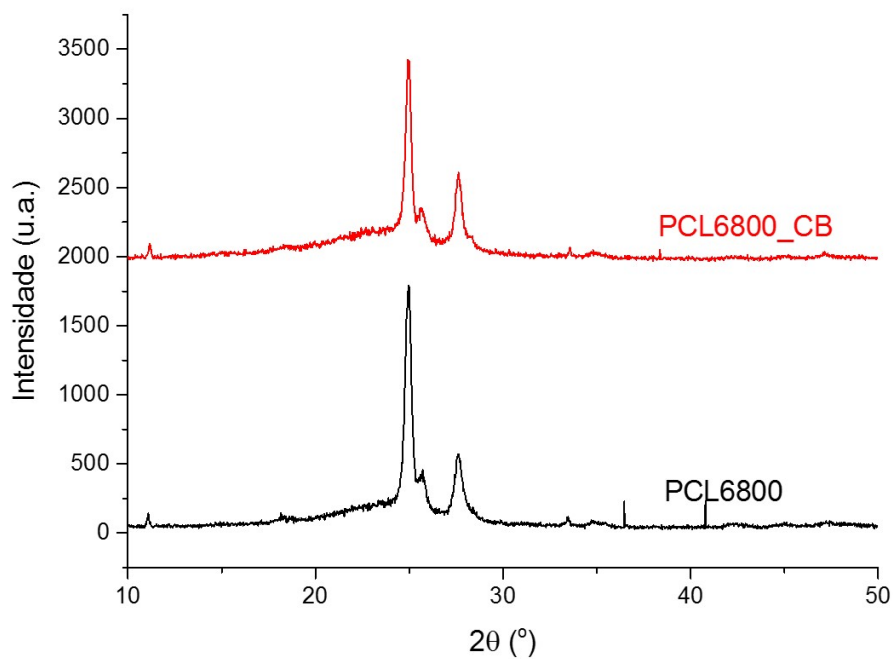
A topografia dos provetes porosos foi avaliada por IFM (Figura 3.15). Apesar da impressão ter sido realizada de modo a que o poro quadrado tivesse  $l_{poro} = 0,35$  mm, as dimensões do poro de PCL 6800 são de  $0,52 \times 0,09$  mm (A) e de PCL 8502A de  $0,20 \times 0,16$  mm (B).



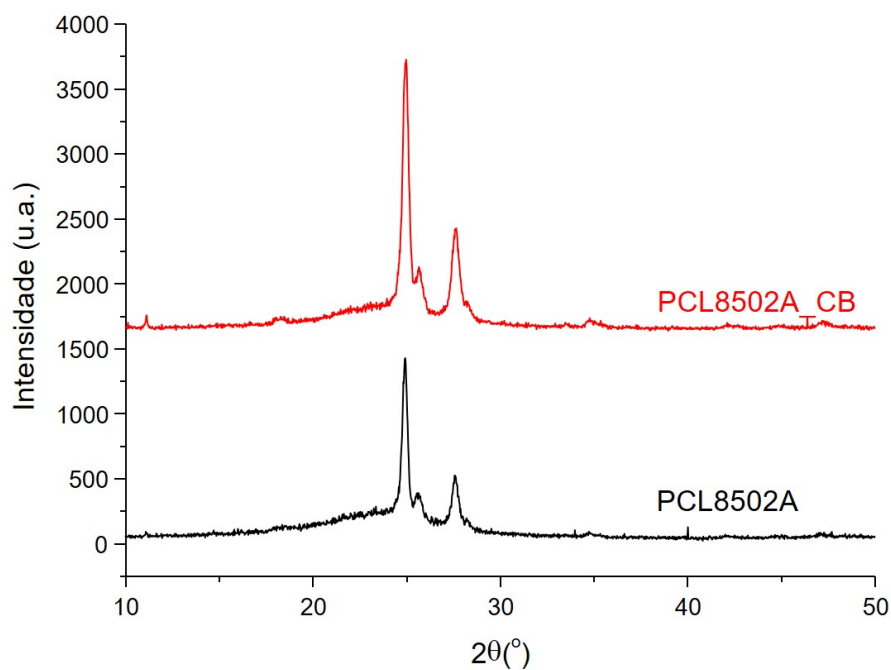
**Figura 3.15:** Imagens óticas dos provetes porosos de PCL 6800 (A) e respetivo perfil (C) e de PCL 8502A (B) e respetivo perfil (D).

### 3.2.2 Análise estrutural

A análise de XRD foi também realizada em cada tipo de PCL e compósitos (Figuras 3.16 e 3.17), de modo a avaliar o efeito da incorporação da CB. Os difratogramas da PCL 6800 e PCL 8502A puros são característicos de um material semi-cristalino, com três picos de difração bem definidos a  $\theta = 25^\circ$ ,  $2\theta = 26,3^\circ$  e  $2\theta = 27,5^\circ$ .



**Figura 3.16:** Difratoograma da PCL 6800 a preto e do PCL6800/CB a vermelho.



**Figura 3.17:** Difratoograma da PCL 8502A a preto e do PCL8502A/CB a vermelho.

Os difratogramas dos compósitos mostram, essencialmente, o padrão de difração da PCL, não sendo notória a incorporação da CB. Tal deve-se ao teor bastante reduzido do reforço que não ocupa uma fração de volume analisada capaz de ser detetado pelo equipamento que, ao contrário do que foi utilizado na caracterização da CB, não é um microdifratómetro.

#### 3.2.3 Análise química

A identificação dos grupos funcionais da CB, da PCL 6800, da PCL 8502A e dos compósitos foi realizada por FTIR.

O espectro da CB está na Figura 3.18 e as bandas estão referenciadas na Tabela 3.3. Na Figura 3.19 estão os espectros da PCL 6800 e respetivo compósito (PCL6800/CB) a azul escuro e claro, respetivamente. Na Figura 3.20 estão representados os espectros da PCL 8502A a laranja e do compósito PCL8502A/CB a amarelo. Na Tabela 3.4 estão identificadas as bandas do espectro da PCL e respetivas ligações químicas.

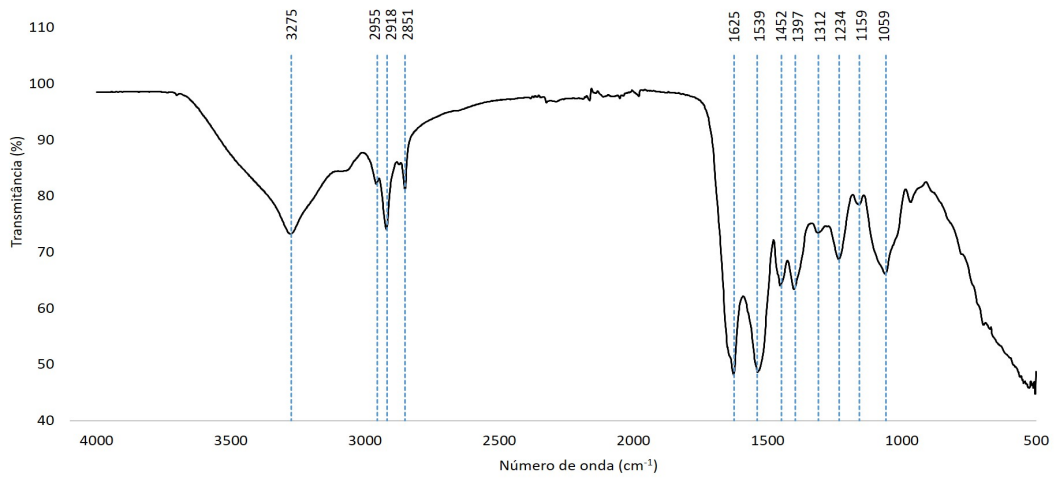


Figura 3.18: Espectro de FTIR da CB.

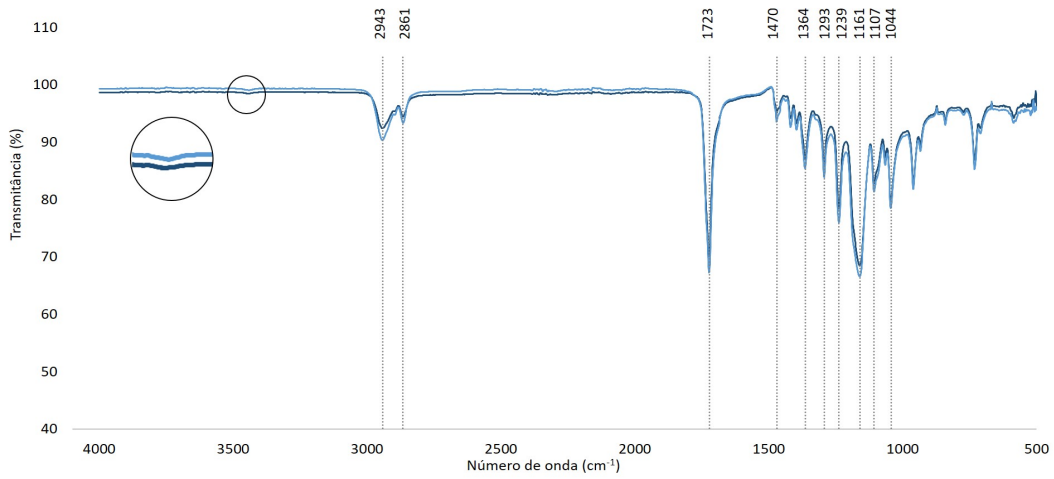


Figura 3.19: Espectro de FTIR da PCL 6800 (escuro) e respetivo compósito (claro).

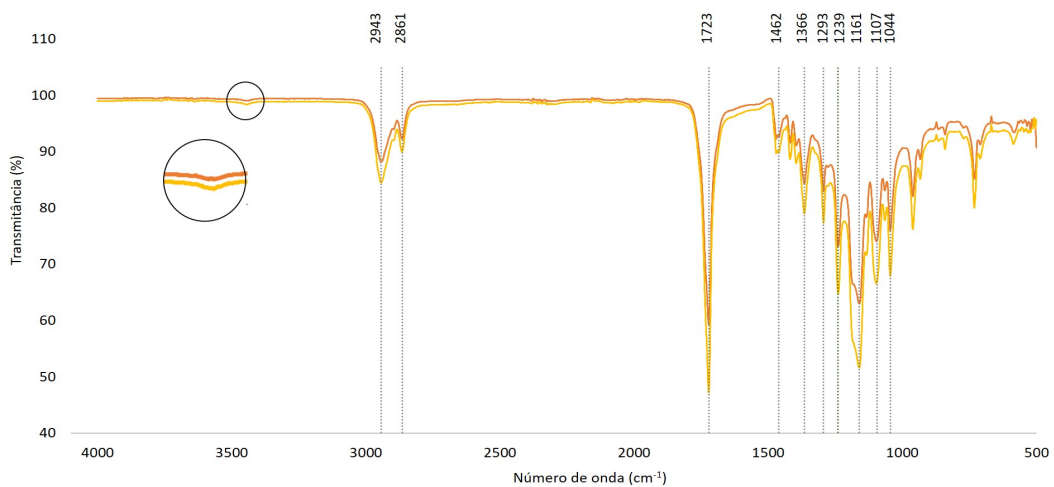


Figura 3.20: Espectro de FTIR da PCL 8502A (escuro) e do seu compósito (claro).

**Tabela 3.3:** Bandas do espectro FTIR da CB.

<b>Bandas (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Grupos</b>	<b>Referências</b>
3275	OH vibração de alongação	[32]
2955	CH <sub>2</sub> vibração de alongação	[86]
2918	CH <sub>2</sub> vibração de alongação	[87]
2851	CH <sub>2</sub> vibração de alongação	[86]
1625	Absorção de H <sub>2</sub> O	[88]
1539	C-C em anel, vibração de alongação	[89]
1452	C-H vibração de flexão	[86]
1397	C-H deformação	[90]
1312	CH <sub>2</sub> vibração de ponta	[88]
1234	OH deformação no plano	[86]
1159	C-O-C vibração de alongação antissimétrica	[19]
1059	C-O vibração de alongação nas ligações glicosídicas	[4]

**Tabela 3.4:** Bandas do espectro FTIR da PCL.

<b>Bandas (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Grupos</b>	<b>Referências</b>
2943	CH <sub>2</sub> vibração de alongação assimétrica	[40, 91]
2861	CH <sub>2</sub> vibração de alongação simétrica	[91]
1723	C=O vibração de alongação	[19]
1470	C-H vibração de flexão e deformação simétrica	[42]
1364	C-H vibração de flexão e deformação simétrica	[42]
1293	C-O e C-C vibração de alongação (fase cristalina)	[40, 92]
1239	C-O-C vibração de alongação assimétrica	[92]
1161	C-O e C-C vibração de alongação (fase amorfa)	[91]
1107	C-O-C vibração de alongação simétrica	[91]
1044	C-O-C vibração de alongação simétrica	[91]

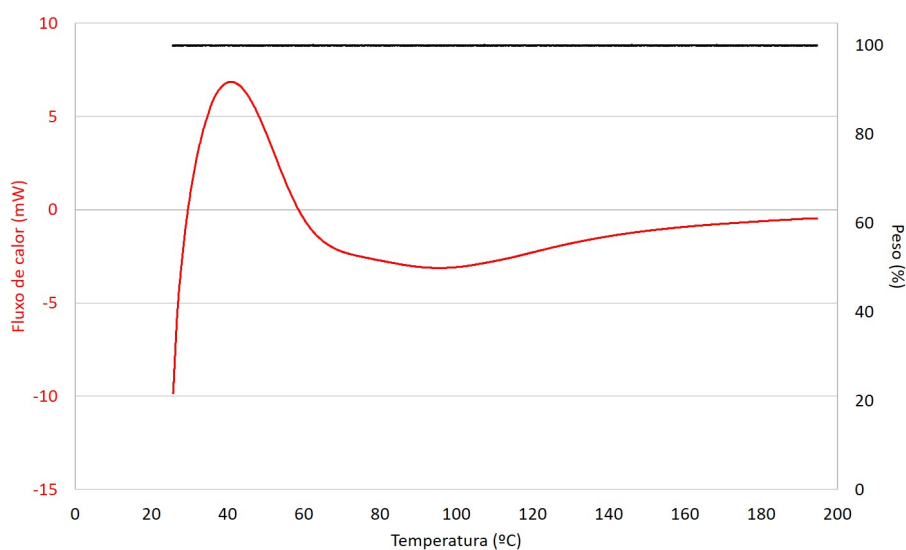
As ligações químicas identificadas no espectro da CB comprovam que se trata de um material polimérico celulósico. Os espectros dos compósitos são muito semelhantes aos de PCL, devido ao baixo teor de CB. A banda a 1539 cm<sup>-1</sup> (C-C em anel, vibração de alongação) é apenas característica da CB e não é visível nos espectros dos compósitos. A ausência de novos picos característicos nos espectros dos compósitos

confirma que não foram formados novos grupos funcionais, tal como era expectável, e que apenas ocorreu interação entre a matriz e o reforço [36]. As bandas a  $1723\text{ cm}^{-1}$  (C=O vibração de alongação),  $1239\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C vibração de alongação assimétrica),  $1161\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C vibração de alongação na fase amorfa),  $1107\text{ cm}^{-1}$  e  $1044\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C vibrações de alongação simétrica) do compósito PCL 8502A/CB são mais intensas que as do PCL 6800/CB, o que sugere uma melhor contribuição da CB, neste caso particular.

### 3.2.4 Análise térmica

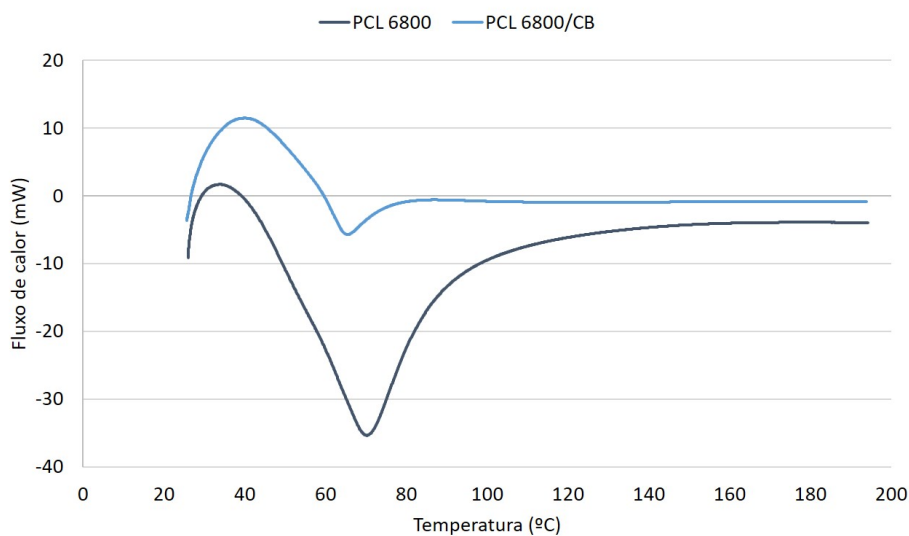
O comportamento térmico da CB, dos homopolímeros (PCL 6800 e PCL 8502A) e dos compósitos (PCL 6800/CB e PCL 8502A/CB) foi avaliado por DSC e TGA. A curva de DSC da CB (Figura 3.21) não permitiu identificar a sua temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) ou temperatura de fusão ( $T_f$ ). Por outro lado, as  $T_f$  dos homopolímeros e das misturas poliméricas estão bem definidas nas curvas de DSC (Figuras 3.22 e 3.23). As  $T_f$  estão identificadas na Tabela 3.5.

Na Figura 3.21 está também registada a variação de peso com a temperatura da CB. No intervalo de temperaturas estudado não ocorreu perda de massa, nem degradação da CB. O mesmo foi observado nas análises dos homopolímeros e respectivos copolímeros (registos não apresentados).

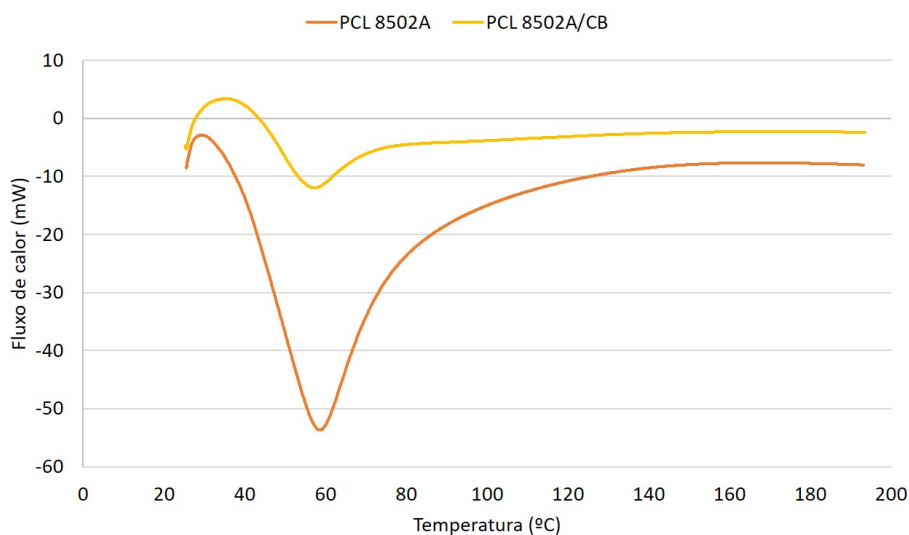


**Figura 3.21:** Termograma de DSC e TGA da CB.

### 3. Resultados e Discussão



**Figura 3.22:** Curva de DSC da PCL 6800 e respetivo compósito.



**Figura 3.23:** Curva de DSC da PCL 8502A e respetivo compósito.

**Tabela 3.5:** Temperaturas de fusão ( $T_f$ ) dos homopolímeros e compósitos.

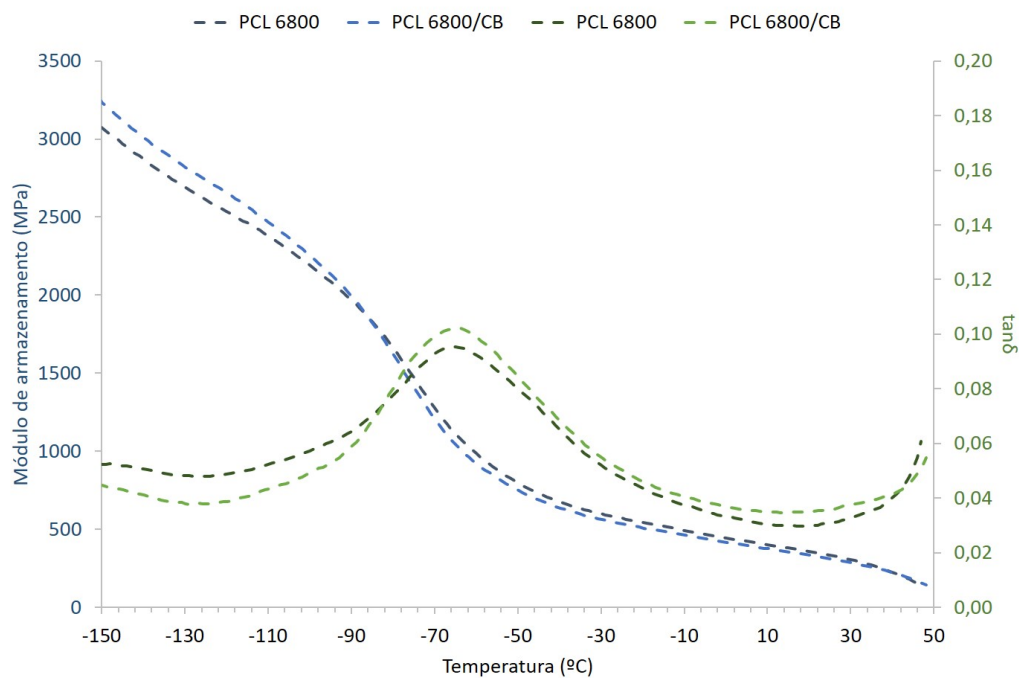
	$T_f$ (°C)
PCL 6800	70
PCL 6800/CB	65
PCL 8502A	59
PCL 8502A/CB	57

Não foi encontrada qualquer referência às propriedades térmicas da CB pro-



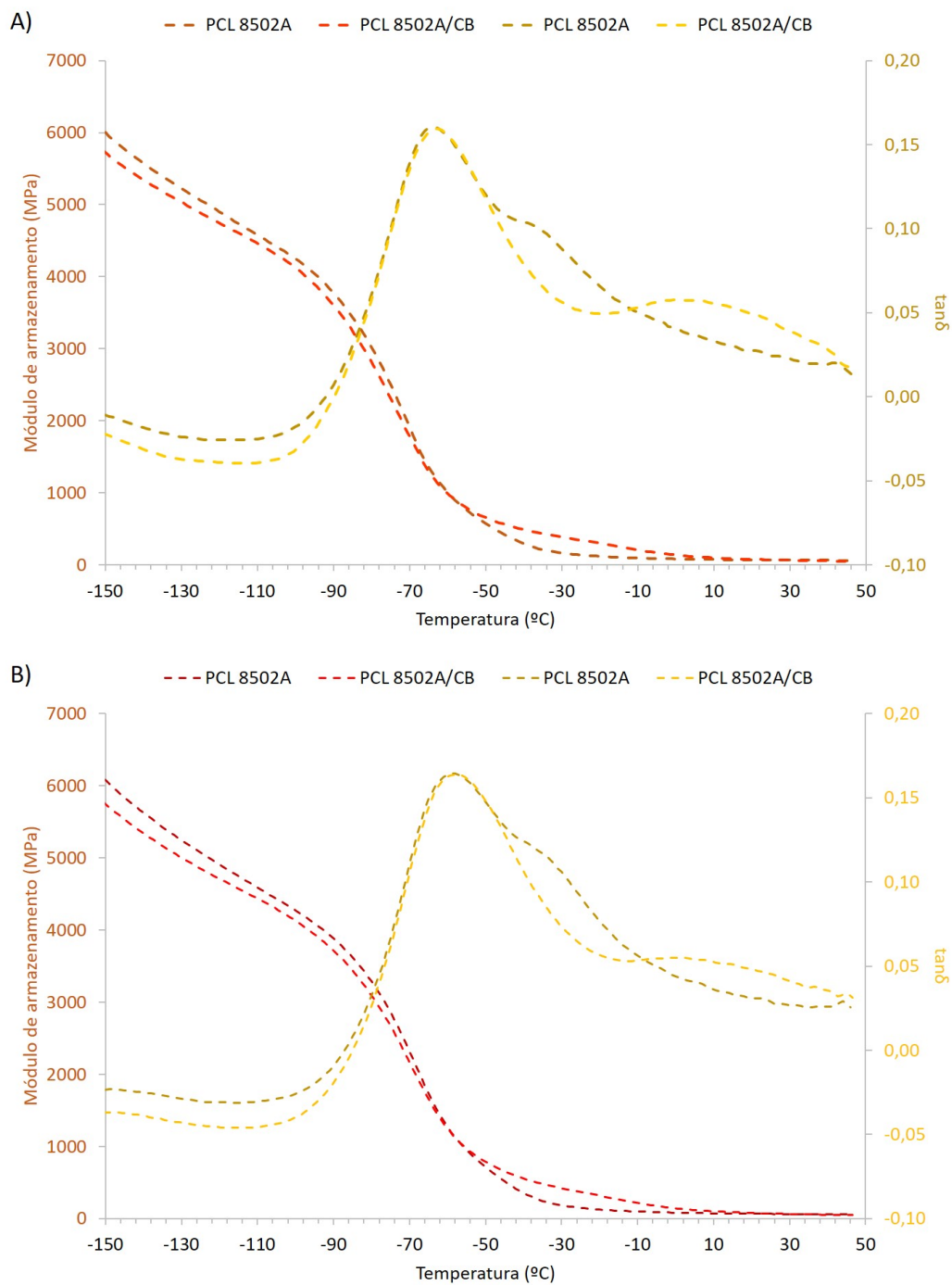
duzida pela *P. myrsinacearum* na literatura consultada, razão pela qual não é possível realizar uma comparação com os valores do presente trabalho. Quanto à PCL, segundo a literatura, a sua temperatura de fusão pode variar entre 59 °C e 64 °C dependendo de fatores como o peso molecular [3, 39]. A PCL 6800 apresenta uma  $T_f$  mais elevada que a PCL 8502A, provavelmente devido ao superior peso molecular. A mistura com a CB conduziu à diminuição da  $T_f$ , nos dois homopolímeros, devido a um ligeira diminuição da ordem estrutural dos homopolímeros devido à incorporação da CB.

Os compósitos foram também caracterizados por DMTA num intervalo de temperaturas entre -150 °C e 50 °C, o que permitiu determinar as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ). As curvas de PCL 6800 e PCL 6800/CB estão representadas na Figura 3.24, e as de PCL 8502A e PCL 8502A/CB na Figura 3.25. Das quatro frequências testadas (1 Hz, 2Hz, 5Hz e 10 Hz) apenas são representadas as curvas obtidas a 1 Hz para o homopolímero de PCL 6800 e respetivo compósito e a 1Hz e 10 Hz para a PCL 8502A e respetivo compósito. Na Tabela 3.6 estão as  $T_g$  determinadas para cada material a 1 Hz.



**Figura 3.24:** Curva de DMTA da PCL 6800 e respetivo compósito (Frequência=1Hz).

### 3. Resultados e Discussão



**Figura 3.25:** Curva de DMTA da PCL 8502A e respectivo compósito a uma frequência de 1Hz (A) e 10 Hz (B).

**Tabela 3.6:** Temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) dos provetes.

	$T_g$ (°C)
PCL 6800	-66
PCL 6800/CB	-65
PCL 8502A	-64
PCL 8502A/CB	-63

De acordo com a literatura, a temperatura de transição vítrea da PCL é de -60 °C [3, 31, 42]. As curvas são típicas de um polímero semicristalino na medida em que para temperaturas baixas o módulo de armazenamento ( $E'$ ) é da ordem dos GPa (3GPa para PCL 6800 e 6GPa para PCL 8502A) devido à existência dos domínios amorfos. Com efeito, para temperaturas inferiores a  $T_g$  o polímero apresenta um comportamento frágil, que é caracterizado por valores de  $E$  elevados. O  $E'$  representa a rigidez de um material viscoelástico e é proporcional à energia armazenada durante o ensaio. Uma vez que o  $E'$  da PCL 8502A e respetivo compósito é muito superior ao da PCL 6800 e PCL 6800/CB, conclui-se que a PCL 8502A é mais rígida. Enquanto que a adição da CB na PCL 6800 resulta num aumento do  $E'$  e, portanto, atua como reforço efetivo, no caso da PCL 8502A acontece o contrário, onde atua como plasticizante. Por volta de -70 °C é observada uma diminuição considerável do  $E'$ , o que corresponde à transição vítrea ( $T_g$ ). Apesar de estabilizar aos -30 °C volta a diminuir devido à fusão dos domínios cristalinos. O mesmo é observado no caso da PCL 8502A e respetivo compósito.

O fator de perda ( $\tan\delta$ ) ou amortecimento é uma medida da energia dissipada pelo material. O valor máximo do  $\tan\delta$  da PCL 6800 com e sem CB ( $\tan\delta_{max}=0,1$ ) é inferior ao valor máximo de  $\tan\delta$  da PCL 8502A com e sem CB ( $\tan\delta_{max}=0,16$ ). Isto indica que a PCL 8502A apresenta uma componente de deformação plástica superior, isto é, a PCL 6800 é mais elástica. Ao adicionar a CB, a  $T_g$  aumenta apenas 1 °C. Este efeito estabilizador da CB é concordante com o encontrado na literatura e está relacionado com a limitação da mobilidade da porção amorfa do polímero [93].

### 3.2.5 Molhabilidade

A medição do ângulo de contacto permite avaliar uma dada superfície quanto à sua hidrofiliidade. Neste trabalho, dado que se pretende uma aplicação na área da biomedicina, é considerada superfície hidrófila quando  $\theta < 65^\circ$  e hidrófoba quando  $\theta > 65^\circ$  [72]. Os ângulos de contacto estáticos das membranas estão na Tabela 3.7. Segundo a literatura, a CB produzida pelas famílias *Acetobacter* e *Komagataeibacter* é hidrófila [32, 51]. No entanto, a CB produzida pela espécie *P. myrsinacearum* é hidrófoba ( $\theta = 123^\circ$ ). Não é possível comparar este valor, uma vez que não foi encontrada na bibliografia qualquer referência ao polímero da matriz extracelular produzido pela espécie *P. myrsinacearum*, quer em artigos científicos quer em patentes. O ângulo de contacto da PCL reportado na literatura é de  $71^\circ$  no caso da  $M_n=80000$  g/mol e de  $70^\circ$  para uma  $M_n=50000$  g/mol [43]. A PCL 8502A apesar de ter  $M_n=50000$  tem grupos -OH.

**Tabela 3.7:** Medição dos ângulos de contacto estáticos da CB, PCL 6800, PCL 8502A e respetivos compósitos.

Membrana	Ângulo de contacto ( $^\circ$ )
CB	$122 \pm 2$
PCL 6800	$83 \pm 4$
PCL 6800/CB	$93 \pm 1$
PCL 8502A	$76 \pm 2$
PCL 8502A/CB	$91 \pm 3$

Apesar dos valores de ângulo de contacto dos homopolímeros ser superior ao reportado pela literatura, a PCL 6800 apresenta um ângulo de contacto superior ao da PCL 8502A. Seria já expectável que a PCL 8502A fosse menos hidrófoba que a PCL 6800, na medida em que apresenta mais grupos -OH. Não obstante o teor de CB adicionado aos homopolímeros ser reduzido, os compósitos são mais hidrófobos que os homopolímeros. O carácter hidrófobo da CB é mais acentuado no caso da mistura PCL 8502A/CB (cerca de 20%) do que na PCL 6800/CB (cerca de 12%). Este resultado vem ao encontro do observado em DMTA, onde, aparentemente, o efeito da adição da CB é mais notório na PCL 8502A do que na PCL 6800.

A celulose bacteriana reportada na literatura é hidrófila e, portanto, alguns estudos foram realizados para hidrofobizar a sua superfície de modo a melhorar a compatibilidade com matrizes de polímeros hidrófobos [27]. No presente estudo, a natureza do biopolímero é hidrófoba bem como a da matriz polimérica (PCL). Deste modo, o reforço e a matriz são compatíveis e a sua interação é, à partida,

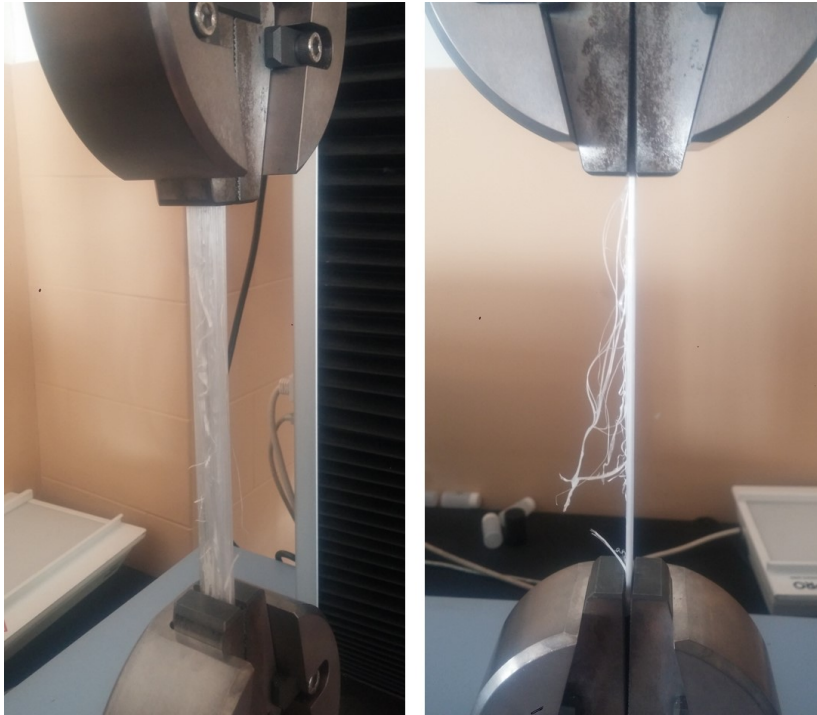
facilitada. A natureza hidrófoba do biopolímero faz com que não seja necessário proceder a modificações químicas que visem hidrofobizar a superfície do material. Algumas substituições de grupos hidrófilos da celulose por outros hidrófobos foram conduzidas por diversos grupos de investigação, nomeadamente por esterificação e acilação [60, 94].

### **3.2.6 Propriedades mecânicas**

As propriedades mecânicas dos provetes foram avaliadas por ensaios de tração e flexão. Para cada tipo de ensaio foram estudados, em primeiro lugar, os provetes com impressão 3D longitudinal e transversal e depois os porosos.

#### **a) Ensaio de Tração Uniaxial**

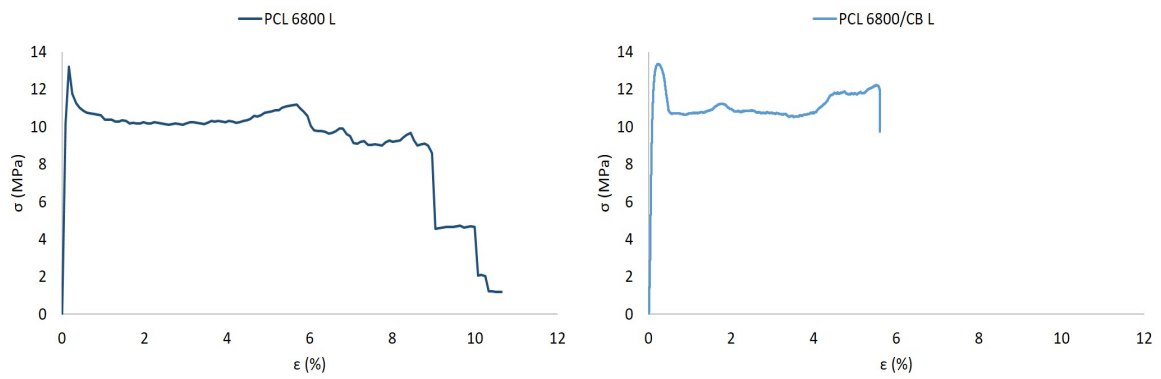
O ensaio de tração dos provetes longitudinais e transversais está representado nas Figuras 3.26 e 3.27, respetivamente. A resposta mecânica normalizada de cada material sujeito ao ensaio de tração está representada nas Figuras 3.28, 3.29, 3.30 e 3.31.



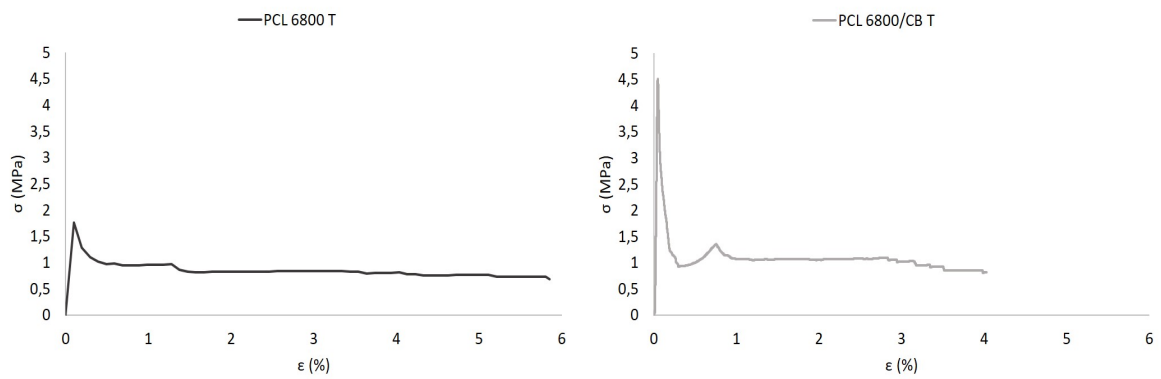
**Figura 3.26:** Ensaio de tração dos provetes impressos longitudinalmente.



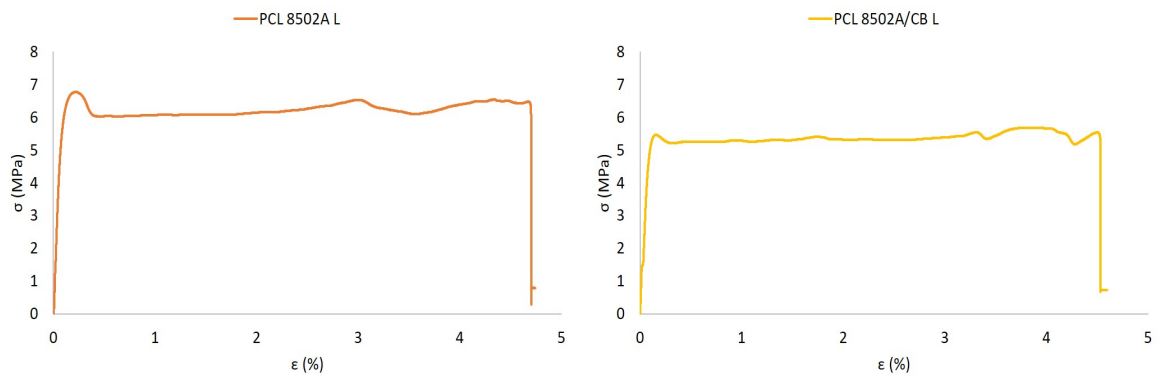
**Figura 3.27:** Ensaio de tração dos provetes impressos transversalmente.



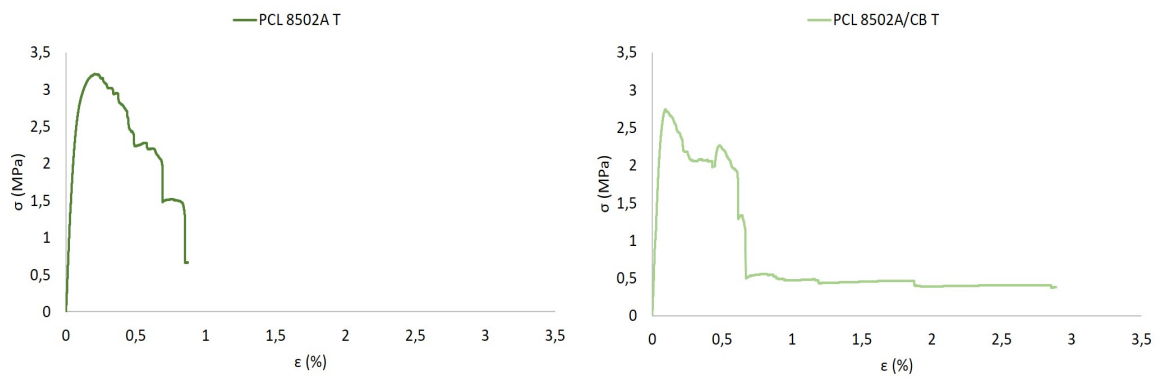
**Figura 3.28:** Curvas tensão-deformação da PCL 6800 L e PCL 6800/CB L.



**Figura 3.29:** Curvas tensão-deformação da PCL 6800 T e PCL 6800/CB T.



**Figura 3.30:** Curvas tensão-deformação da PCL 8502A L e PCL 8502A/CB L.



**Figura 3.31:** Curvas tensão-deformação da PCL 8502A T e PCL 8502A/CB T.

### 3. Resultados e Discussão

As propriedades mecânicas de cada provete foram determinadas a partir da análise da curva  $\sigma - \epsilon$ . Na Tabela 3.8 estão representados os valores da resistência à tração ( $\sigma_{max}$ ), que é em todos os provetes superior à tensão de rotura ( $\sigma_{rot}$ ), a deformação à rotura ( $\epsilon$ ) e o módulo de elasticidade tangencial (E).

**Tabela 3.8:** Propriedades mecânicas dos provetes sujeitos ao ensaio de tração uniaxial.

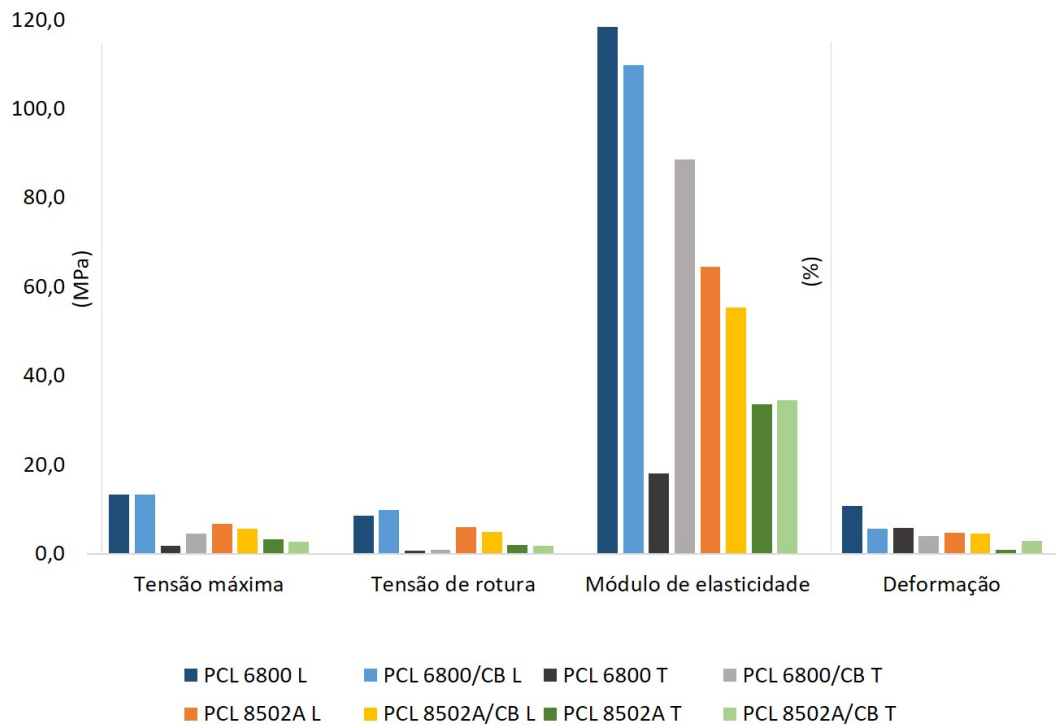
Provete	$\sigma_{max}$ (MPa)	$\sigma_{rot}$ (MPa)	$\epsilon$ (%)	E (MPa)
PCL 6800 L	13,2	8,6	10,7	118,4
PCL 6800/CB L	13,4	9,7	5,6	109,8
PCL 6800 T	1,8	0,7	5,9	18,0
PCL 6800/CB T	4,5	0,8	4,0	85,5
PCL 8502A L	6,8	6,0	4,8	64,5
PCL 8502A/CB L	5,7	5,0	4,6	55,3
PCL 8502A T	3,2	1,9	0,9	33,5
PCL 8502A/CB T	2,8	1,8	2,9	34,5

Para uma melhor comparação entre os provetes impressos longitudinal e transversalmente e, ainda, com e sem reforço, na Figura 3.32 está representado um gráfico de colunas das propriedades mecânicas.

Em todos os gráficos do ensaio de tração é observada uma queda na tensão para valores crescentes de deformação associada a uma deformação plástica antes da fratura, isto é, a falha catastrófica do material. O módulo de elasticidade de um material compósito depende da disposição das fibras e da interação entre a matriz e a fibra.

Tal como se esperava, os provetes longitudinais apresentam um módulo de elasticidade superior aos impressos transversalmente. Também a tensão máxima, e deformação à rotura são superiores. As propriedades mecânicas superiores no modo de impressão longitudinal devem-se à disposição das fibras paralela e na direção da força aplicada. Durante o ensaio de tração, os provetes longitudinais sofrem um fenómeno de estrição superior aos transversais e a estrição é alastrada a todo o provete. Os provetes contendo PCL 6800 impressos na longitudinal apresentam superior módulo de elasticidade e ductilidade que os provetes constituídos por PCL 8502A. A PCL 6800 tem maior peso molecular que a PCL 8502A e, portanto, há um aumento do número das forças de ligação intermoleculares o que se traduz numa maior resistência mecânica. Quando reforçados, os dois tipos de PCL longitudinais apresentam menor deformação (48% e 4% na PCL 6800 e 8502A, respetivamente) e





**Figura 3.32:** Gráfico de colunas das propriedades mecânicas obtidas de cada provete.

módulo de elasticidade (7% e 14% na PCL 6800 e 8502A, respetivamente). Por outro lado, comparativamente à PCL 6800 L, o PCL 6800/CB L tem associados valores superiores de resistência mecânica, ao contrário do que acontece com a PCL 8502A L em relação ao mesmo homopolímero reforçado.

Na impressão transversal, o provete de PCL 8502A tem valores superiores de resistência mecânica à tração e módulo de elasticidade mas inferior deformação que a PCL 6800 T. A PCL 8502A apesar de ter menor massa molecular que a PCL 6800 tem dois grupos -OH por molécula que lhe permitem uma interação intermolecular acrescida. Consequentemente, a sua resistência mecânica à tração é superior, neste modo de impressão. Enquanto que a CB aumenta o módulo de elasticidade nos dois tipos de PCL (375% na PCL 6800 e 3% na PCL 8502A), o seu comportamento não é igual em ambos os polímeros no que diz respeito às restantes propriedades. No caso da PCL 6800, a CB resulta em valores superiores de tensão máxima e de rotura mas à diminuição da deformação. O contrário acontece com a PCL 8502A, na qual a CB diminuiu a resistência mecânica mas aumentou a deformação. Assim, enquanto que a PCL 85002A T é mais resistente à tração e rígida que a PCL 6800 T, na presença da CB o composto PCL 8502A/CB T apresenta um valor inferior de resistência mecânica à tração e de módulo de elasticidade, comparativamente ao

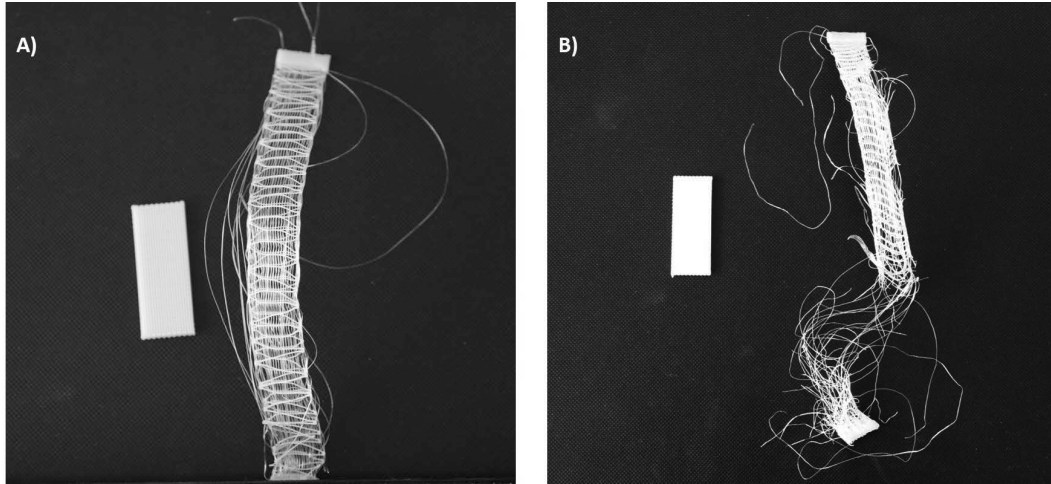
PCL 6800/CB T.

Todos os compósitos, à exceção do PCL 8502A/CB T, são menos dúcteis que os respetivos homopolímeros. A CB atua, aparentemente, de modo contrário ao de um plasticizante, incrementando as interações intermoleculares, tal como referido anteriormente [36].

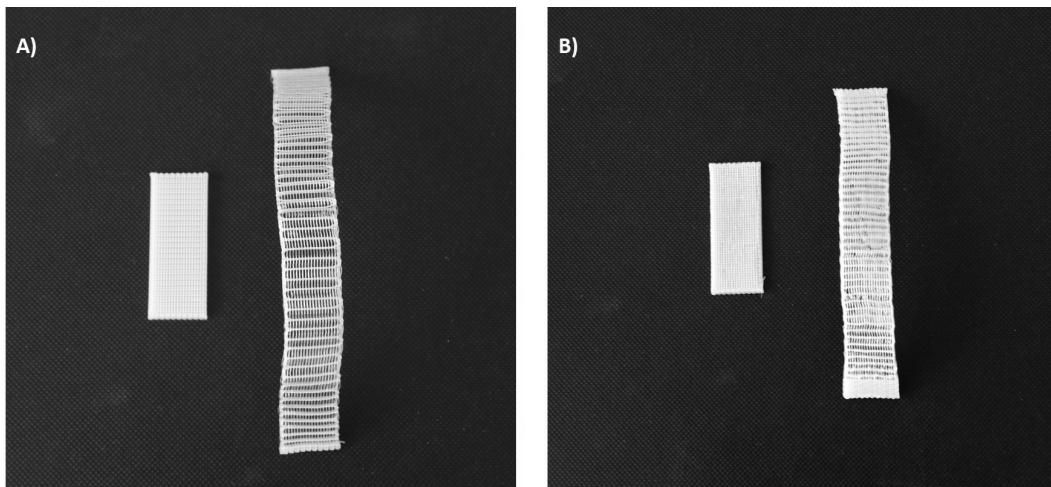
Em suma, o reforço da CB resultou em compósitos menos rígidos, no modo de impressão longitudinal, e mais rígidos no transversal. Quanto ao PCL 6800/CB, o reforço originou um aumento dos valores de resistência mecânica à tração e da tensão de rotura e diminuição da deformação. Quanto à PCL 8502A, a CB originou uma diminuição da resistência mecânica e da tensão de rotura, bem como da deformação no caso da impressão longitudinal e um aumento da deformação na transversal.

Era expectável que o reforço de CB resultasse num aumento da cristalinidade e numa estrutura densa constituída por nanofibras de reduzido tamanho e, portanto, em propriedades mecânicas superiores [32]. Na verdade, a CB apenas melhorou a resistência mecânica da PCL 6800, nos dois tipos de impressão e, o módulo de elasticidade tanto da PCL 6800 e PCL 8502A apenas na impressão transversal.

Os provetes impressos com porosidade foram também sujeitos ao ensaio de tração uniaxial (Figuras 3.33 e 3.34). As curvas tensão-deformação estão representadas nas Figuras 3.35 e 3.36 e as propriedades mecânicas na Tabela 3.9

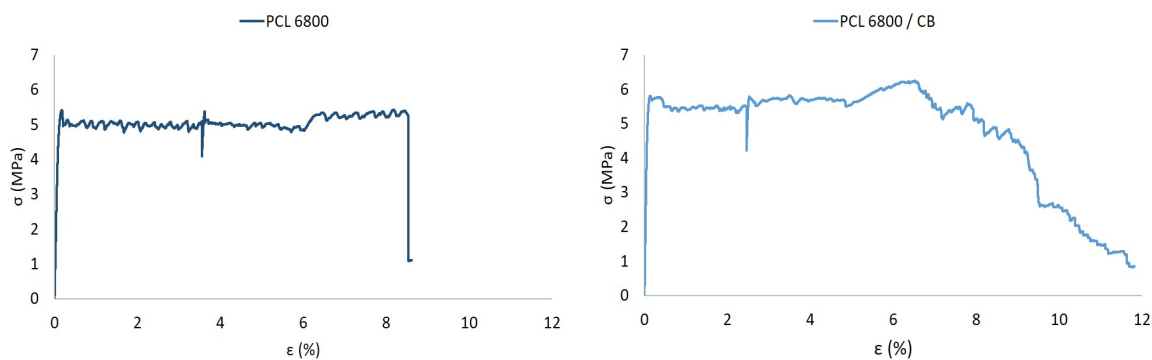


**Figura 3.33:** Provetes porosos de PCL 6800 (A) e PCL 6800/CB (B), antes e após ensaio de tração.



**Figura 3.34:** Provede poroso de PCL 8502A (A) e PCL 8502A/CB (B), antes e após ensaio de tração.

### 3. Resultados e Discussão



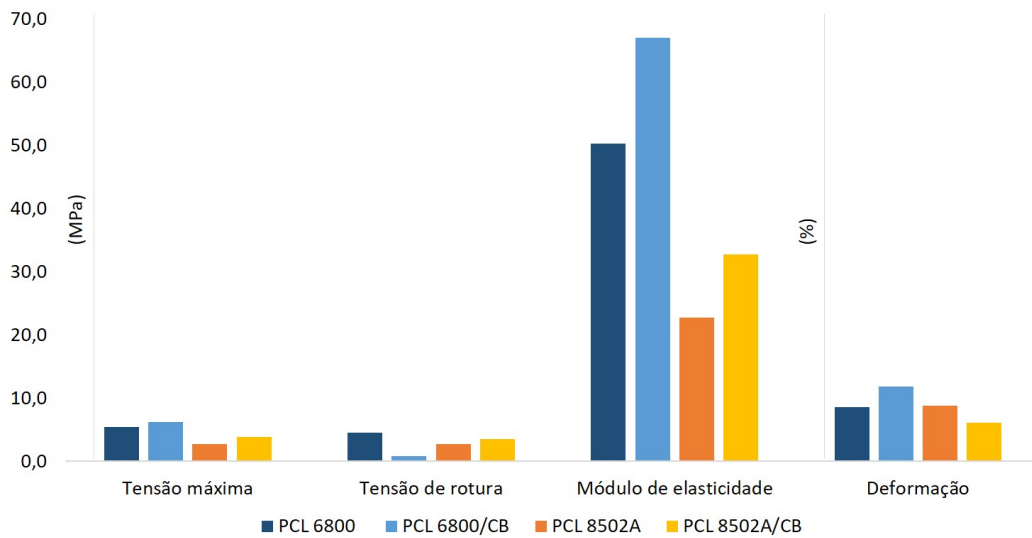
**Figura 3.35:** Curvas tensão-deformação dos provetes porosos PCL 6800, sem e com a CB.



**Figura 3.36:** Curvas tensão-deformação dos provetes porosos PCL 8502A, sem e com a CB.

**Tabela 3.9:** Propriedades mecânicas dos provetes porosos sujeitos ao ensaio de tração uniaxial.

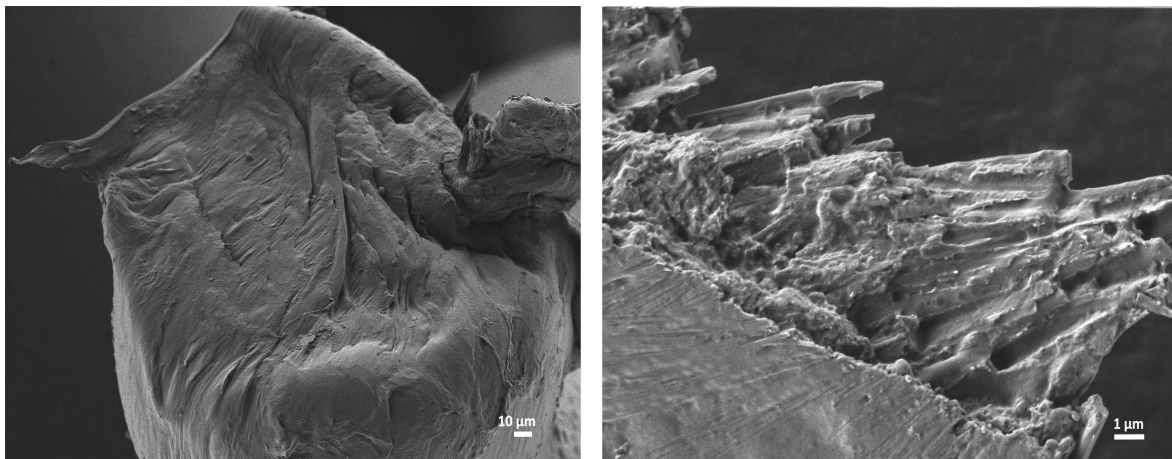
Proвете	$\sigma_{max}$ (MPa)	$\sigma_{rot}$ (MPa)	$\epsilon$ (%)	E (MPa)
PCL 6800	5,4	4,5	8,6	50,2
PCL 6800/CB	6,2	3,5	11,8	67,0
PCL 8502A	2,8	2,7	8,8	22,7
PCL 8502A/CB	3,8	3,5	6,1	32,7



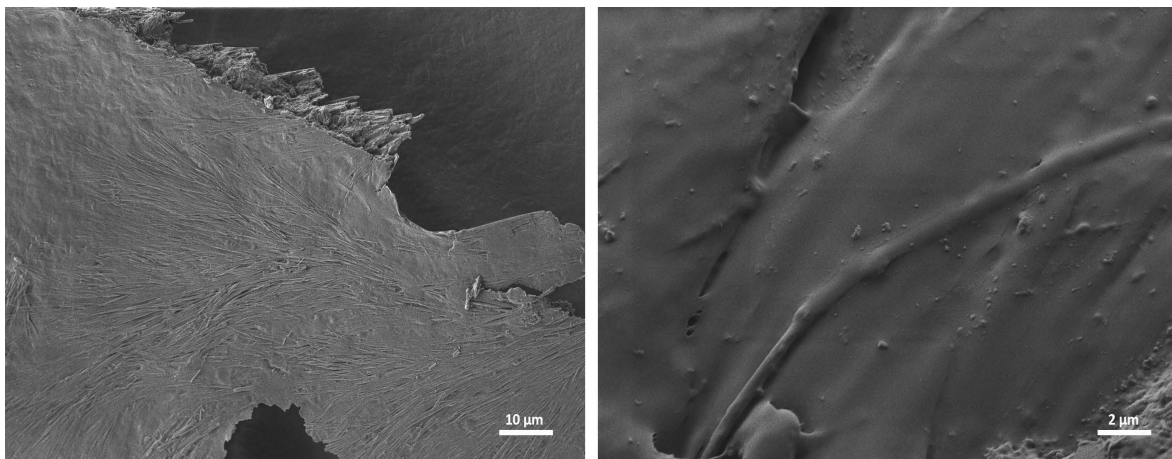
**Figura 3.37:** Gráfico de colunas das propriedades mecânicas de cada provete poroso.

Os provetes porosos apresentam propriedades mecânicas intermédias, comparativamente aos longitudinais e transversais. Os provetes com PCL 6800 apresentam, mais uma vez, valores superiores de módulo de elasticidade e resistência mecânica à tração que os provetes com PCL 8502A. Aqueles reforçados com CB são mais rígidos (aumento de 33% no PCL 6800/CB e 44% no PCL 8502A/CB) e têm também uma resistência à tração superior (15% e 36% no PCL 6800/CB e 8502A/CB, respetivamente). Relativamente à ductilidade, quando adicionada à PCL 6800, a CB torna-o mais dúctil (aumento de 37%), ao contrário do que acontece quando incorporada na PCL 8502A (diminuição de 31%). A resposta mecânica do PCL 6800/CB é totalmente diferente das restantes, o que resulta numa ductilidade superior e tensão de rotura inferior que a PCL 6800. Conclui-se, portanto, que a CB funciona como um reforço, na medida em que torna os provetes mais resistentes mecanicamente e rígidos.

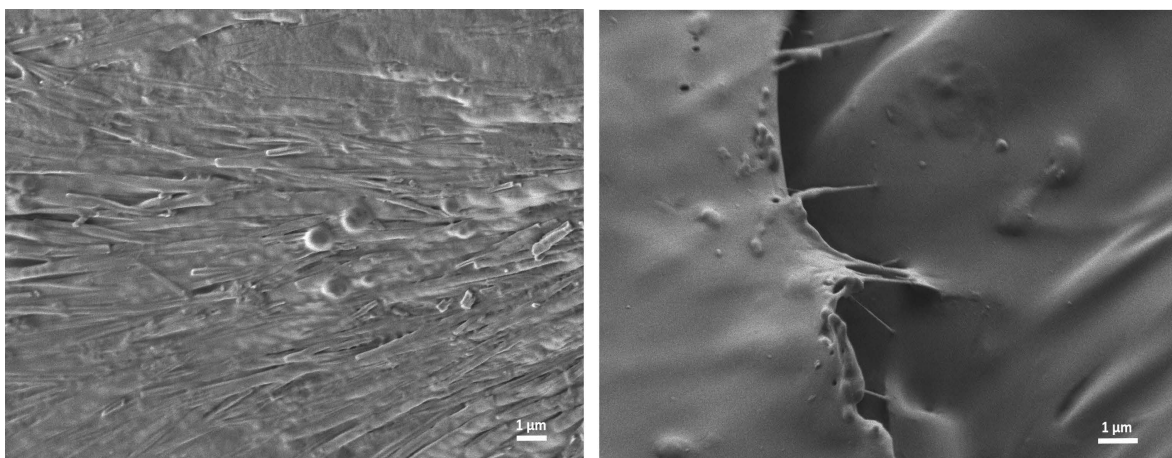
A morfologia dos provetes após os ensaios foi observada por SEM e foi observada a boa ligação do reforço da CB à matriz de PCL, de acordo com o exemplificado para o provete PCL 6800/CB (Figuras 3.38, 3.39 e 3.40).



**Figura 3.38:** Morfologia do compósito PCL 6800/CB no local de rotura, após tração.



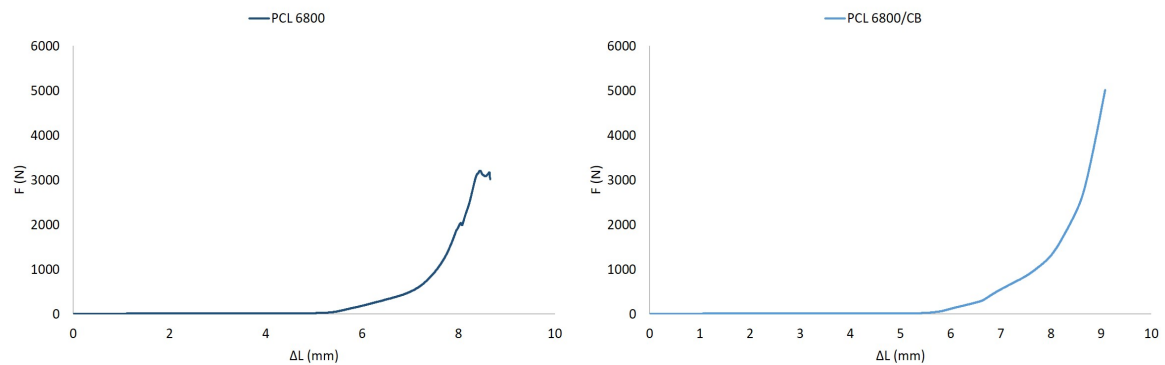
**Figura 3.39:** Morfologia do compósito PCL 6800/CB tracionado.



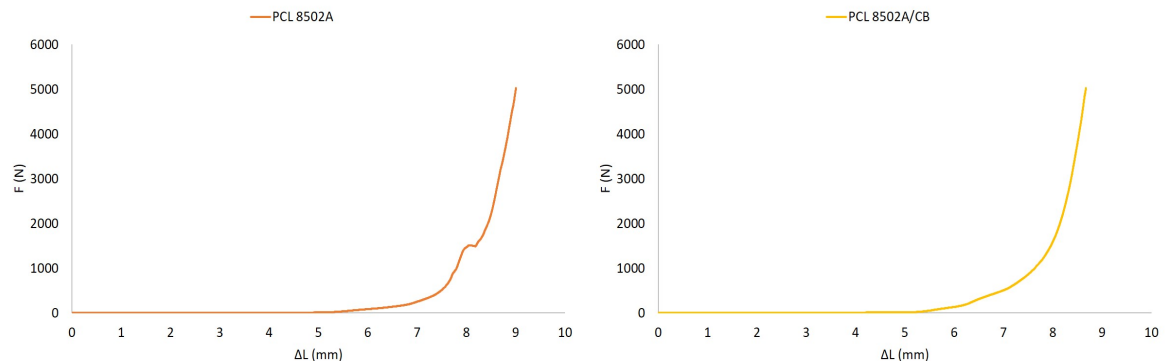
**Figura 3.40:** Morfologia do compósito PCL 6800/CB tracionado.

## b) Ensaio de Flexão

As curvas de força-deslocamento ( $F-\Delta L$ ) dos provetes porosos de PCL 6800 e respectivo compósito estão representadas na Figura 3.41 e as da PCL 8502A e PCL 8502A/CB na Figura 3.42. Os parâmetros flexurais (tensão de flexão ( $\sigma$ ) e módulo de elasticidade à flexão ( $E$ )) e a força máxima ( $F_{max}$ ) estão resumidos na Tabela 3.10 e, de um modo esquemático, na Figura 3.43.



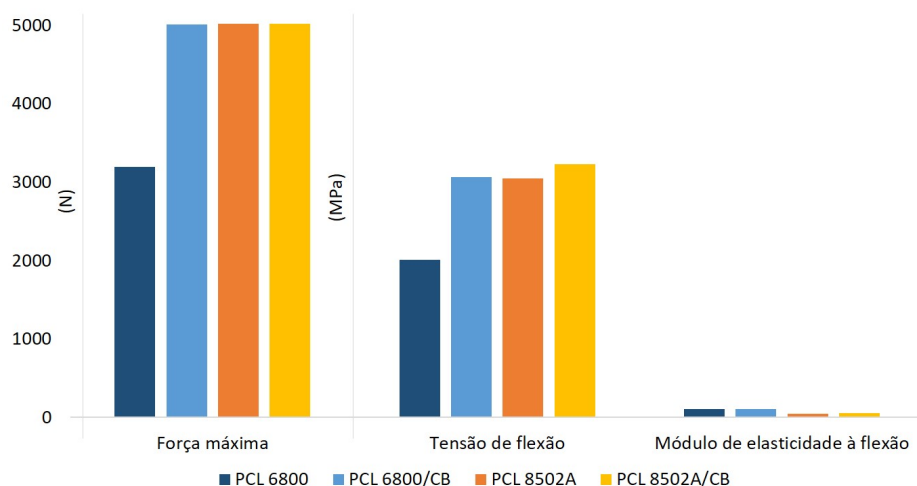
**Figura 3.41:** Curvas força-deslocamento dos provetes porosos PCL 6800, sem e com a CB.



**Figura 3.42:** Curvas força-deslocamento dos provetes porosos PCL 8502A e do seu compósito.

**Tabela 3.10:** Propriedades mecânicas dos provetes porosos sujeitos ao ensaio de flexão.

Proвете	$F_{max}$ (N)	$\sigma$ (MPa)	$E$ (MPa)
PCL 6800	3198,6	2013,8	104,1
PCL 6800/CB	5014,5	3060,8	109,2
PCL 8502A	5020,1	3046,4	45,0
PCL 8502A/CB	5018,1	3232,3	54,1

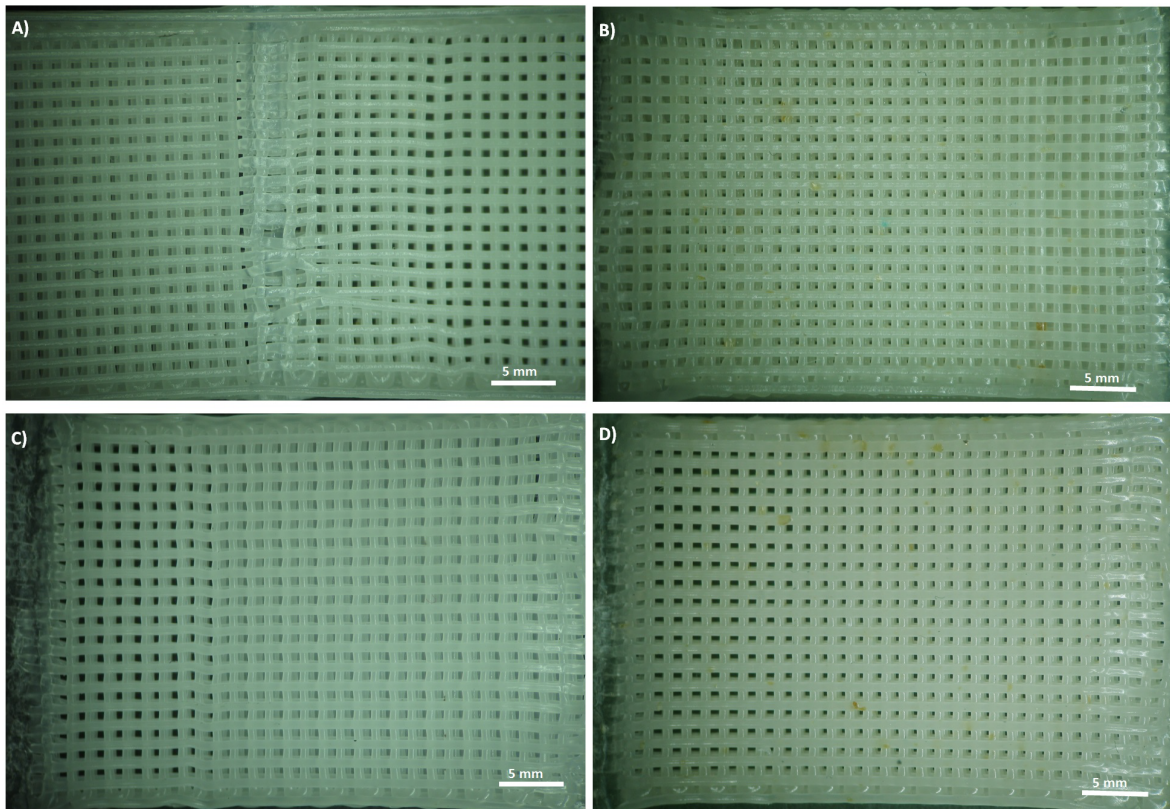


**Figura 3.43:** Gráfico de colunas das propriedades mecânicas retiradas a partir do ensaio de flexão.

Ao contrário do que se registou no ensaio de tração uniaxial, quando sujeito à flexão o polímero PCL 6800 apresenta um valor de força máxima inferior ao do PCL 8502A e, portanto, menor tensão de flexão. O módulo de elasticidade associado à PCL 6800 é superior ao da PCL 8502A, com ou sem aditivo. Ao reforçar com a CB, tanto a tensão à flexão como o módulo de elasticidade à flexão aumentaram. No caso do PCL 6800/CB o aumento da tensão à flexão foi significativo (cerca de 52%). A adição de CB à PCL 8502A resultou numa diminuição pouco significativa da força máxima de flexão e, no caso da PCL 6800 num aumento de 57%. Uma vez mais, a CB comportou-se como um reforço mecânico.



A deformação originada pelo ensaio de flexão foi observada à lupa (Figura 3.44).



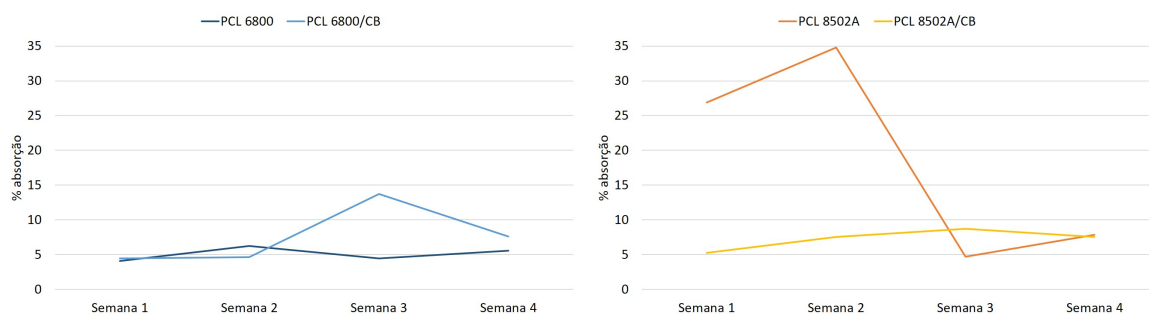
**Figura 3.44:** Deformação dos provetes PCL 6800 (A), PCL 6800/CB (B), PCL 8502A (C) e PCL 8502A/CB (D) após ensaio de flexão.

### 3.2.7 Testes *in vitro*

O poder de absorção de SBF dos quatro tipos de provetes porosos e a sua degradação foram avaliados durante quatro semanas. Na Figura 3.45 está representada a cinética de absorção dos provetes associados à PCL 6800, à esquerda e à PCL 8502A, à direita.

Tal como se esperava, a capacidade de absorção de SBF pela PCL 8502A é superior à da PCL 6800, uma vez que é mais hidrófila (ângulo de contacto da PCL 8502A é de  $76^\circ$  e da PCL 6800 é de  $83^\circ$ ). A cinética de absorção dos homopolímeros é superior nas duas primeiras semanas e, no caso do PCL 8502A, entre as segunda e terceira semanas, a diminuição é abrupta. A cinética de absorção pelos compósitos foi máxima na terceira semana e depois diminuiu. A incorporação da CB na PCL 8502A resulta numa estabilização do seu comportamento, isto é, controla a percentagem de absorção de SBF. No caso do PCL 6800/CB, apesar do ângulo de contacto

### 3. Resultados e Discussão



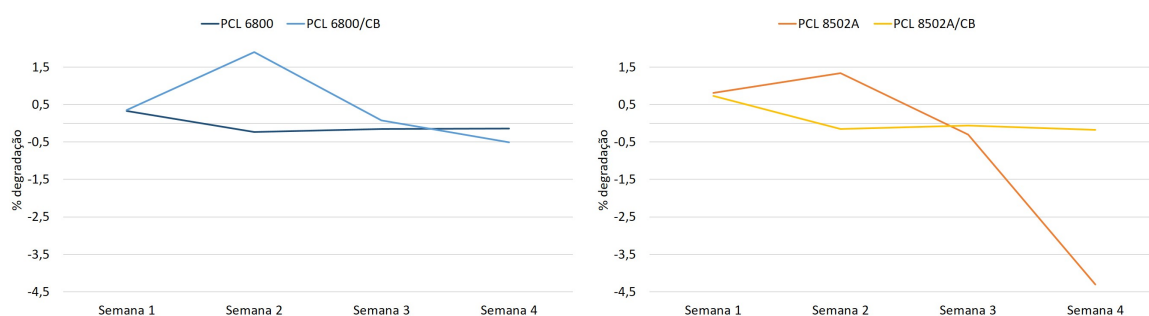
**Figura 3.45:** Absorção de SBF nos quatro tipos de provetes.

ser superior ( $\theta = 93^\circ$ ), a CB parece diminuir a capacidade de absorção apenas nas duas primeiras semanas. No entanto, dada a cristalinidade e o caráter hidrófobo dos polímeros utilizados é expectável que as % de absorção fossem baixas.

A perda de massa associada a cada provete ao longo das quatro semanas está sumariada na Tabela 3.11 e apresentada na Figura 3.46.

**Tabela 3.11:** Degradação percentual dos provetes porosos, ao longo de quatro semanas.

	Perda de massa (%)			
	PCL 6800	PCL 6800/CB	PCL 8502A	PCL 8502A/CB
<b>Semana 1</b>	$0,33 \pm 0,07$	$0,35 \pm 0,06$	$0,81 \pm 0,18$	$0,73 \pm 0,20$
<b>Semana 2</b>	$-0,24 \pm 0,33$	$1,89 \pm 3,03$	$1,34 \pm 0,37$	$-0,15 \pm 0,53$
<b>Semana 3</b>	$-0,15 \pm 0,04$	$0,08 \pm 0,15$	$-0,30 \pm 0,05$	$-0,06 \pm 0,12$
<b>Semana 4</b>	$-0,15 \pm 0,02$	$-0,51 \pm 0,07$	$-4,31 \pm 5,21$	$-0,17 \pm 0,18$



**Figura 3.46:** Cinética da degradação dos quatro tipos de provetes ao longo de quatro semanas.

A degradação de todos os materiais é muito reduzida, devido à sua natureza hidrófoba. O pico de degradação do composto de PCL 6800 ocorre na segunda semana e, à exceção da quarta semana, a perda de massa é sempre superior quando comparada com a do seu homopolímero. A degradação da PCL 8502A é superior

à do seu compósito apenas nas duas primeiras semanas. Enquanto que as degradações da PCL 6800 e do PCL 8502A/CB foram estáveis ao longo das quatro semanas, o PCL 6800/CB e a PCL 8502A apresentaram um pico acentuado de degradação na segunda semana. Após a segunda semana a degradação do PCL 6800/CB estabilizou, ao contrário da degradação do PCL 8502A, que diminuiu abruptamente até à quarta semana. Deste modo, a perda de massa é mais controlada apenas quando a CB é incorporada na matriz da PCL 8502A. No entanto, dado que este teste foi apenas realizado uma vez para cada tipo de material, seria conveniente repetir a análise para confirmar o tipo de evolução observada.



# Conclusões

O objetivo do presente estudo foi avaliar dois compósitos poliméricos com aplicações biomédicas. Os compósitos constituídos por PCL Capa 6800 e PCL Capa 8502A foram reforçados com o biopolímero produzido pela estirpe bacteriana *P. myrsinacearum* e impressos tridimensionalmente por processo aditivo. Os principais resultados da caracterização podem ser sumariados:

- o biopolímero produzido pela *P. myrsinacearum* é celulose bacteriana (CB) de estrutura semicristalina;
- a CB é de natureza hidrófoba ( $\theta = 123^\circ$ ), ao contrário da CB reportada na literatura; este facto permite compatibilidade química com polímeros hidrófobos, nomeadamente a PCL, que é um dos polímeros aprovados pela FDA para aplicações biomédicas;
- as propriedades mecânicas da CB avaliadas por nanoindentação são superiores às reportadas na literatura;
- a incorporação da CB nos dois polímeros sintéticos de PCL tornou-os mais hidrófobos e termicamente mais estáveis, uma vez que a  $T_g$  aumentou;
- foram testados vários modos de impressão sendo que os provetes impressos longitudinalmente apresentam o melhor conjunto de propriedades mecânicas;
- os compósitos impressos com porosidade apresentam módulos de elasticidade à tração e à flexão superiores, comparativamente aos respetivos homopolímeros;
- devido à natureza hidrófoba dos homopolímeros e dos compósitos, a absorção e degradação, em SBF, ao longo de um mês é reduzida;

Como trabalho futuro é sugerido a otimização da produção da CB através, por exemplo, de um biorreator e também da metodologia de extração, de modo a aumentar a sua pureza. Para além da impressão 3D dos compósitos de PCL/CB,

## Conclusões

---

que apresentam propriedades mecânicas superiores aos homopolímeros de PCL, seria interessante realizar a impressão 4D, através da qual se poderia estudar o comportamento da CB em resposta a certos estímulos externos, tais como o pH e a temperatura.

# Referências bibliográficas

- [1] R. Lanza, R. Langer, and J. P. Vacanti, *Principles of tissue engineering*. Academic press, 2007.
- [2] D. F. Williams, *The Williams dictionary of biomaterials*. Liverpool University Press, 1999.
- [3] M. Abedalwafa, F. Wang, L. Wang, and C. Li, “Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A review,” *Reviews on Advanced Materials Science*, vol. 34, no. 2, pp. 123–140, 2013.
- [4] X. Lv, J. Yang, C. Feng, Z. Li, S. Chen, M. Xie, J. Huang, H. Li, H. Wang, and Y. Xu, “Bacterial Cellulose-Based Biomimetic Nanofibrous Scaffold with Muscle Cells for Hollow Organ Tissue Engineering,” *ACS Biomaterials Science and Engineering*, vol. 2, no. 1, pp. 19–29, 2016.
- [5] D. Howard, L. D. Buttery, K. M. Shakesheff, and S. J. Roberts, “Tissue engineering: Strategies, stem cells and scaffolds,” *Journal of Anatomy*, vol. 213, no. 1, pp. 66–72, 2008.
- [6] D. Eberli, L. F. Filho, A. Atala, and J. J. Yoo, “Composite scaffolds for the engineering of hollow organs and tissues,” *Methods*, vol. 47, no. 2, pp. 109–115, 2009.
- [7] L. S. Nair and C. T. Laurencin, “Biodegradable polymers as biomaterials,” *Progress in Polymer Science (Oxford)*, vol. 32, no. 8-9, pp. 762–798, 2007.
- [8] W. Callister and D. Rethwisch, *Materials science and engineering: an introduction*, vol. 94. John Wiley & Sons, 2007.
- [9] C. Carraher, “Polymer Chemistry,” *Marcel Dekker*, pp. 36–44, 2003.
- [10] K. Balani, V. Verma, A. Agarwal, and R. Narayan, *Biosurfaces: A Materials Science and Engineering Perspective*. John Wiley & Sons, 2015.

- [11] J. Venugopal and S. Ramakrishna, "Biocompatible nanofiber matrices for the engineering of a dermal substitute for skin regeneration.," *Tissue engineering*, vol. 11, no. 5-6, pp. 847–854, 2005.
- [12] P. Lembre, C. Lorentz, and P. Di, "Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World," *The Complex World of Polysaccharides*, pp. 371–392, 2012.
- [13] B. H. Rehm, "Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications.," *Nature reviews. Microbiology*, vol. 8, no. 8, pp. 578–592, 2010.
- [14] M. S. Dayal and J. M. Catchmark, "Mechanical and structural property analysis of bacterial cellulose composites," *Carbohydrate Polymers*, vol. 144, pp. 447–453, 2016.
- [15] J. Brown, "XLIII-On an Acetic Ferment which forms Cellulose," *J Chem. Soc.*, vol. 49, pp. 432–439, 1886.
- [16] W. Czaja, A. Krystynowicz, S. Bielecki, and R. M. Brown, "Microbial cellulose - The natural power to heal wounds," *Biomaterials*, vol. 27, no. 2, pp. 145–151, 2006.
- [17] F. Esa, S. M. Tasirin, and N. A. Rahman, "Overview of Bacterial Cellulose Production and Application," *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, vol. 2, pp. 113–119, 2014.
- [18] S. Bielecki, A. Krystynowicz, and Marianna, "Bacterial Cellulose," *Cellulose*, vol. i, pp. 37–46, 1989.
- [19] C. Zaharia, E. Vasile, B. Galateanu, M.-C. Bunea, A. Casarica, and P. O. Stanescu, "Bacterial Cellulose-polyhydroxyalkanoates Composites," *Materiale Plastice*, vol. 51, no. 1, pp. 119–123, 2014.
- [20] A. R. P. Figueiredo, A. G. P. R. Figueiredo, N. H. C. S. Silva, A. Barros-Timmons, A. Almeida, A. J. D. Silvestre, and C. S. R. Freire, "Antimicrobial bacterial cellulose nanocomposites prepared by in situ polymerization of 2-aminoethyl methacrylate," *Carbohydrate Polymers*, vol. 123, pp. 443–453, 2015.
- [21] M. Ul-Islam, J. H. Ha, T. Khan, and J. K. Park, "Effects of glucuronic acid oligomers on the production, structure and properties of bacterial cellulose," *Carbohydrate Polymers*, vol. 92, no. 1, pp. 360–366, 2013.



- 
- [22] N. Shah, M. Ul-Islam, W. A. Khattak, and J. K. Park, "Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material," *Carbohydrate Polymers*, vol. 98, no. 2, pp. 1585–1598, 2013.
- [23] F. Torres, S. Commeaux, and O. Troncoso, "Biocompatibility of Bacterial Cellulose Based Biomaterials," *Journal of Functional Biomaterials*, vol. 3, no. 4, pp. 864–878, 2012.
- [24] J. Kim, Z. Cai, and Y. Chen, "Biocompatible Bacterial Cellulose Composites for Biomedical Application," *Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine*, vol. 1, no. 1, pp. 011006–1–011006–7, 2010.
- [25] R. M. Sheltami, H. Kargarzadeh, and I. Abdullah, "Thermal Properties of Cellulose Nanocomposites," *Handbook of Nanocellulose and Cellulose Nanocomposites*, 2017.
- [26] M. L. Cacicedo, M. C. Castro, I. Servetas, L. Bosnea, K. Boura, P. Tsafrakidou, A. Dima, A. Terpou, A. Koutinas, and G. R. Castro, "Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications," *Bioresource Technology*, 2015.
- [27] K. Y. Lee, Y. Aitomäki, L. A. Berglund, K. Oksman, and A. Bismarck, "On the use of nanocellulose as reinforcement in polymer matrix composites," *Composites Science and Technology*, vol. 105, pp. 15–27, 2014.
- [28] R. da Silva, M. R. Sierakowski, H. P. Bassani, S. F. Zawadzki, C. L. Pirich, L. Ono, and R. A. de Freitas, "Hydrophilicity improvement of mercerized bacterial cellulose films by polyethylene glycol graft," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 86, pp. 599–605, 2016.
- [29] C. S. Julie Chandra, N. George, and S. K. Narayanankutty, "Isolation and characterization of cellulose nanofibrils from arecanut husk fibre," *Carbohydrate Polymers*, vol. 142, pp. 158–166, 2016.
- [30] N. Yildirim and S. Shaler, "The application of nanoindentation for determination of cellulose nanofibrils (CNF) nanomechanical properties," *Materials Research Express*, vol. 3, no. 10, p. 105017, 2016.
- [31] N. Pircher, S. Veigel, N. Aigner, J. M. Nedelec, T. Rosenau, and F. Liebner, "Reinforcement of bacterial cellulose aerogels with biocompatible polymers," *Carbohydrate Polymers*, vol. 111, pp. 505–513, 2014.
- [32] L. Rozenberga, M. Skute, L. Belkova, I. Sable, L. Vikele, P. Semjonovs, M. Saka, M. Ruklisha, and L. Paegle, "Characterisation of films and nanopaper obtai-

- ned from cellulose synthesised by acetic acid bacteria,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 144, pp. 33–40, 2016.
- [33] M. Koyama, H. William, T. Imai, S. Junji, and B. Henrissat, “Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose,” *Biophysics*, vol. 94, pp. 9091–9095, 1997.
- [34] E. Erbas Kiziltas, A. Kiziltas, K. Rhodes, N. W. Emanetoglu, M. Blumentritt, and D. J. Gardner, “Electrically conductive nano graphite-filled bacterial cellulose composites,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 136, pp. 1144–1151, 2016.
- [35] J. Kim, Z. Cai, H. S. Lee, G. S. Choi, D. H. Lee, and C. Jo, “Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/Chitosan composite for potential biomedical application,” *Journal of Polymer Research*, vol. 18, no. 4, pp. 739–744, 2011.
- [36] L. Urbina, I. Algar, C. García-Astrain, N. Gabilondo, A. González, M. Corcuera, A. Eceiza, and A. Retegi, “Biodegradable composites with improved barrier properties and transparency from the impregnation of PLA to bacterial cellulose membranes,” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 133, no. 28, pp. 1–10, 2016.
- [37] F. J. Van Natta, J. W. Hill, and W. H. Carruthers, “Polymerization and ring formation,  $\epsilon$ -caprolactone and its polymers,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 56, no. 5, pp. 455–459, 1934.
- [38] M. A. Woodruff and D. W. Hutmacher, “The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century,” *Progress in Polymer Science (Oxford)*, vol. 35, no. 10, pp. 1217–1256, 2010.
- [39] H. S. Barud, S. J. L. Ribeiro, C. L. P. Carone, R. Ligabue, S. Einloft, P. V. S. Queiroz, A. P. B. Borges, and V. D. Jahno, “Optically transparent membrane based on bacterial cellulose/polycaprolactone,” *Polímeros*, vol. 23, pp. 135–138, 2013.
- [40] A. R. P. Figueiredo, A. J. D. Silvestre, C. P. Neto, and C. S. R. Freire, “In situ synthesis of bacterial cellulose/polycaprolactone blends for hot pressing nanocomposite films production,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 132, no. July, pp. 400–408, 2015.
- [41] P. S. Tan and S. H. Teoh, “Effect of stiffness of polycaprolactone ( PCL ) membrane on cell proliferation,” *Materials Science and Engineering*, vol. 27, pp. 304–308, 2007.

- [42] X. Qin and D. Wu, "Effect of different solvents on poly(caprolactone) (PCL) electrospun nonwoven membranes," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 107, no. 3, pp. 1007–1013, 2012.
- [43] C.-c. Yeh, C.-n. Chen, Y.-t. Li, M.-y. Cheng, and H.-i. Chang, "The effect of polymer molecular weight and UV radiation on physical properties and bioactivities of PCL," *Cellular Polymers*, vol. 30, no. 5, pp. 227–242, 2011.
- [44] Y. Zhang, H. Ouyang, T. L. Chwee, S. Ramakrishna, and Z. M. Huang, "Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds," *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, vol. 72, no. 1, pp. 156–165, 2005.
- [45] H. Kweon, M. Kyong, I. Kyu, T. Hee, H. Chul, H.-s. Lee, J.-s. Oh, T. Akaike, and C.-s. Cho, "A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 801–808, 2003.
- [46] B. Lindman, G. Karlström, and L. Stigsson, "On the mechanism of dissolution of cellulose," *Journal of Molecular Liquids*, vol. 156, no. 1, pp. 76–81, 2010.
- [47] H.-l. Wu, D. H. Bremner, H.-j. Wang, J.-z. Wu, H.-y. Li, J.-r. Wu, S.-w. Niu, and L.-m. Zhu, "Fabrication and investigation of a biocompatible microfilament with high mechanical performance based on regenerated bacterial cellulose and bacterial cellulose," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 79, pp. 516–524, 2017.
- [48] D. Ray and S. Sain, "In situ processing of cellulose nanocomposites," *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, vol. 83, pp. 19–37, 2016.
- [49] A. G. P. R. Figueiredo, A. R. P. Figueiredo, A. Alonso-Varona, S. C. M. Fernandes, T. Palomares, E. Rubio-Azpeitia, A. Barros-Timmons, A. J. D. Silvestre, C. Pascoal Neto, and C. S. R. Freire, "Biocompatible bacterial cellulose-poly(2-hydroxyethyl methacrylate) nanocomposite films," *BioMed Research International*, vol. 2013, pp. 1–14, 2013.
- [50] T. D. O. Gadim, A. G. P. R. Figueiredo, N. C. Rosero-navarro, C. Vilela, J. A. F. Gamelas, A. Barros-timmons, C. P. Neto, A. J. D. Silvestre, C. S. R. Freire, and F. M. L. Figueiredo, "Nanostructured Bacterial Cellulose - Poly(4-styrene sulfonic acid) Composite Membranes with High Storage Modulus and Protonic Conductivity," *Applied Materials and Interfaces*, vol. 6, pp. 7864–7875, 2014.
- [51] P. S. S. Lacerda, A. M. M. V. Barros-Timmons, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre, and C. P. Neto, "Nanostructured composites obtained by ATRP sleeving of bac-

- terial cellulose nanofibers with acrylate polymers,” *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 6, pp. 2063–2073, 2013.
- [52] J. Ambrosio-Martín, M. J. Fabra, A. Lopez-Rubio, and J. M. Lagaron, “Melt polycondensation to improve the dispersion of bacterial cellulose into polylactide via melt compounding: enhanced barrier and mechanical properties,” *Cellulose*, vol. 22, no. 2, pp. 1201–1226, 2015.
- [53] K. Peng, B. Wang, S. Chen, C. Zhong, and H. Wang, “Preparation and Properties of Polystyrene/Bacterial Cellulose Nanocomposites by In Situ Polymerization,” *Journal of Macromolecular Science, Part B : Physics*, vol. 50, no. 10, pp. 1921–1927, 2011.
- [54] G. Yang, C. Wang, F. Hong, X. Yang, and Z. Cao, “Preparation and characterization of BC/PAM-AgNPs nanocomposites for antibacterial applications,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 115, pp. 636–642, 2015.
- [55] E. E. Brown, M.-p. G. Laborie, and P. O. Box, “Bioengineering Bacterial Cellulose / Poly ( ethylene oxide ) Nanocomposites,” *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 3074–3081, 2007.
- [56] S. Gea, E. Bilotti, C. T. Reynolds, N. Soykeabkeaw, and T. Peijs, “Bacterial cellulose-poly(vinyl alcohol) nanocomposites prepared by an in-situ process,” *Materials Letters*, vol. 64, no. 8, pp. 901–904, 2010.
- [57] H. Luo, G. Xiong, Y. Huang, F. He, Y. Wang, and Y. Wan, “Preparation and characterization of a novel COL/BC composite for potential tissue engineering scaffolds,” *Materials Chemistry and Physics*, vol. 110, no. 2-3, pp. 193–196, 2008.
- [58] C. Zhijiang and Y. Guang, “Optical nanocomposites prepared by incorporating bacterial cellulose nanofibrils into poly(3-hydroxybutyrate),” *Materials Letters*, vol. 65, no. 2, pp. 182–184, 2011.
- [59] W.-S. Chang and H.-H. Chen, “Physical properties of bacterial cellulose composites for wound dressings,” *Food Hydrocolloids*, vol. 53, pp. 75–83, 2016.
- [60] S. Deng, R. Huang, M. Zhou, F. Chen, and Q. Fu, “Hydrophobic cellulose films with excellent strength and toughness via ball milling activated acylation of microfibrillated cellulose,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 154, pp. 129–138, 2016.

- [61] D. Raghunathan, "Production of Microbial Cellulose from the New Bacterial Strain Isolated From Temple Wash Waters," *Microbiology and Applied Sciences*, vol. 2, no. 12, pp. 275–290, 2013.
- [62] J. Goldstein, D. E. Newbury, P. Echlin, D. C. Joy, A. D. Romig Jr, C. E. Lyman, C. Fiori, and E. Lifshin, *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis: a text for biologists, materials scientists, and geologists*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [63] S. Morita, F. J. Giessibl, E. Meyer, and R. Wiesendanger, *Noncontact atomic force microscopy*, vol. 3. Springer, 2015.
- [64] D. Y. Duygu, T. Baykal, I. Açıkgöz, and K. Yildiz, "REVIEW Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy for Biological Studies," *Gazi University Journal of Science*, vol. 22, no. 3, pp. 117–121, 2009.
- [65] C. Berthomieu and R. Hienerwadel, "Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy," *Photosynthesis Research*, vol. 101, no. 2-3, pp. 157–170, 2009.
- [66] S. Hüfner, *Photoelectron spectroscopy: principles and applications*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [67] H. Günther, *NMR spectroscopy: basic principles, concepts and applications in chemistry*. John Wiley & Sons, 2013.
- [68] G. W. H. Höhne, W. Hemminger, and H.-J. Flammersheim, "Theoretical fundamentals of differential scanning calorimeters," in *Differential Scanning Calorimetry*, pp. 21–40, Springer, 1996.
- [69] P. Gabbott, *Principles and applications of thermal analysis*. John Wiley & Sons, 2008.
- [70] S. Gaisford, V. Kett, and P. Haines, *Principles of thermal analysis and calorimetry*. Royal society of chemistry, 2016.
- [71] G. Bracco and B. Holst, *Surface science techniques*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [72] E. A. Vogler, "Water and the acute biological response to surfaces," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 10, no. 10, pp. 1015–1045, 1999.
- [73] A. M. Amaro, L. Bernardo, D. G. Pinto, S. Lopes, J. Rodrigues, and C. S. Louro, "Effect of irregular shaped nanoalumina on the enhancement of mechanical

- properties of epoxy resin nanocomposites using DDM as hardener,” *Composites Part B: Engineering*, vol. 84, no. August, pp. 17–24, 2016.
- [74] L. Müller and F. A. Müller, “Preparation of SBF with different HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> content and its influence on the composition of biomimetic apatites,” *Acta Biomaterialia*, vol. 2, no. 2, pp. 181–189, 2006.
- [75] R. R. Lahiji, X. Xu, R. Reifengerger, A. Raman, A. Rudie, and R. J. Moon, “Atomic force microscopy characterization of cellulose nanocrystals,” *Langmuir*, vol. 26, no. 6, pp. 4480–4488, 2010.
- [76] A. Hirai, M. Tsuji, H. Yamamoto, and F. Horii, “In situ crystallization of bacterial cellulose III. Influences of different polymeric additives on the formation of microfibrils as revealed by transmission electron microscopy,” *Cellulose*, vol. 5, pp. 201–213, 1998.
- [77] T. I. Ragab, A. Wasfy, H. Amer, A. El-Gendi, M. Abdel-Hady, and F. Liebner, “Synthesis of Cellulose Acetate Membrane from Egyptian Rice Straws,” *Journal of Applied Sciences*, vol. 14, pp. 3424–3535, 2014.
- [78] H. Hu, H. Li, Y. Zhang, Y. Chen, Z. Huang, A. Huang, Y. Zhu, X. Qin, and B. Lin, “Green mechanical activation-assisted solid phase synthesis of cellulose esters using a co-reactant : effect of chain length of fatty acids on reaction efficiency and structure properties of products,” *RSC Advances*, vol. 5, pp. 20656–20662, 2015.
- [79] “<sup>1</sup>H NMR Chemical Shifts.” <http://https://www.cpp.edu/~lsstarkey/courses/NMR/NMRshifts1H-general.pdf>. Consultado a 10 de Junho de 2017.
- [80] K. Masuda, M. Adachi, A. Hirai, H. Yamamoto, H. Kaji, and F. Horii, “Solid-state <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H spin diffusion NMR analyses of the microfibril structure for bacterial cellulose,” *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, vol. 23, no. 4, pp. 198–212, 2003.
- [81] R. N. Ibbett, D. Domvoglou, and M. Fasching, “Characterisation of the supramolecular structure of chemically and physically modified regenerated cellulosic fibres by means of high-resolution Carbon-13 solid-state NMR,” *Polymer*, vol. 48, no. 5, pp. 1287–1296, 2007.
- [82] M. Foston, “Advances in solid-state NMR of cellulose,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 27, pp. 176–184, 2014.

- [83] H. Zhao, J. H. Kwak, Y. Wang, J. A. Franz, J. M. White, and J. E. Holladay, "Effects of crystallinity on dilute acid hydrolysis of cellulose by cellulose ball-milling," *Energy & Fuels*, vol. 20, no. 2, pp. 807–811, 2005.
- [84] M. L. Foresti, A. Vázquez, and B. Boury, "Applications of bacterial cellulose as precursor of carbon and composites with metal oxide, metal sulfide and metal nanoparticles: A review of recent advances," *Carbohydrate Polymers*, vol. 157, pp. 447–467, 2017.
- [85] M. Zeng, A. Laromaine, and A. Roig, "Bacterial cellulose films: influence of bacterial strain and drying route on film properties," *Cellulose*, vol. 21, no. 6, pp. 4455–4469, 2014.
- [86] C. Chung, M. Lee, and E. K. Choe, "Characterization of cotton fabric scouring by FT-IR ATR spectroscopy," *Carbohydrate Polymers*, vol. 58, no. 4, pp. 417–420, 2004.
- [87] F. M. Pelissari, P. J. D. A. Sobral, and F. C. Menegalli, "Isolation and characterization of cellulose nanofibers from banana peels," *Cellulose*, vol. 21, no. 1, pp. 417–432, 2014.
- [88] M. Fan, D. Dai, and B. Huang, "Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Natural Fibres," *Fourier Transform - Materials Analysis*, 2012.
- [89] "IR Spectroscopy Tutorial: Aromatics." [http://www.uobabylon.edu.iq/eprints/pubdoc\\_12\\_10125\\_250.doc](http://www.uobabylon.edu.iq/eprints/pubdoc_12_10125_250.doc). Consultado a 16 de Junho de 2017.
- [90] S. N. Monteiro, F. M. Margem, N. Tonini Simonassi, R. L. Loiola, and M. P. Oliveira, "Characterization of Curaua Fibers by Infrared Spectroscopy," *Materials Science Forum*, vol. 775-776, pp. 325–329, 2014.
- [91] E. Abdelrazek, A. Hezma, A. El-khodary, and A. Elzayat, "Spectroscopic studies and thermal properties of PCL/PMMA biopolymer blend," *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 3, no. 1, pp. 10–15, 2016.
- [92] T. Elzein, M. Nasser-Eddine, C. Delaite, S. Bistac, and P. Dumas, "FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 273, no. 2, pp. 381–387, 2004.
- [93] N. Follain, S. Belbekhouche, J. Bras, G. Siqueira, S. Marais, and A. Dufresne, "Water transport properties of bio-nanocomposites reinforced by *Luffa cylindrica* cellulose nanocrystals," *Journal of Membrane Science*, vol. 427, no. 2, pp. 218–229, 2013.

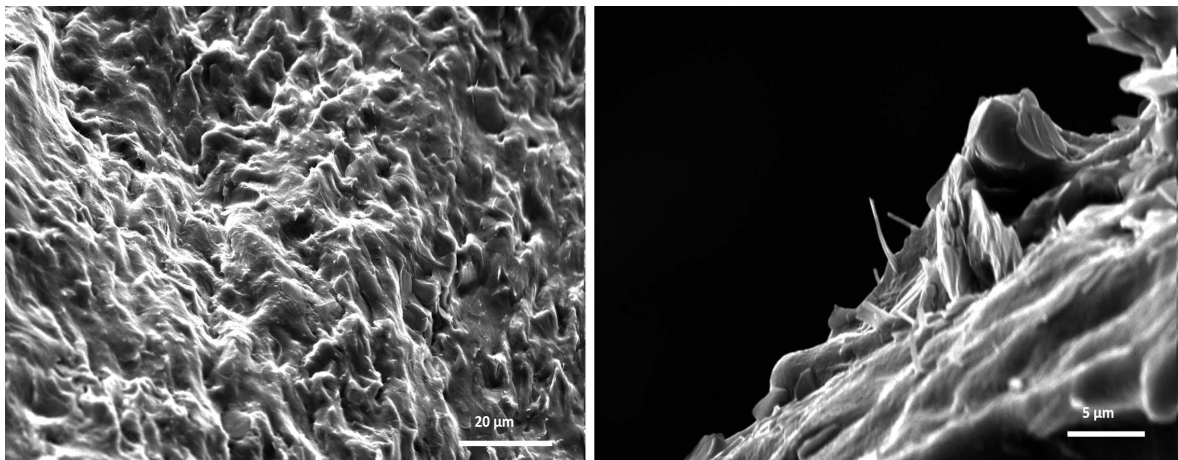
## Referências bibliográficas

---

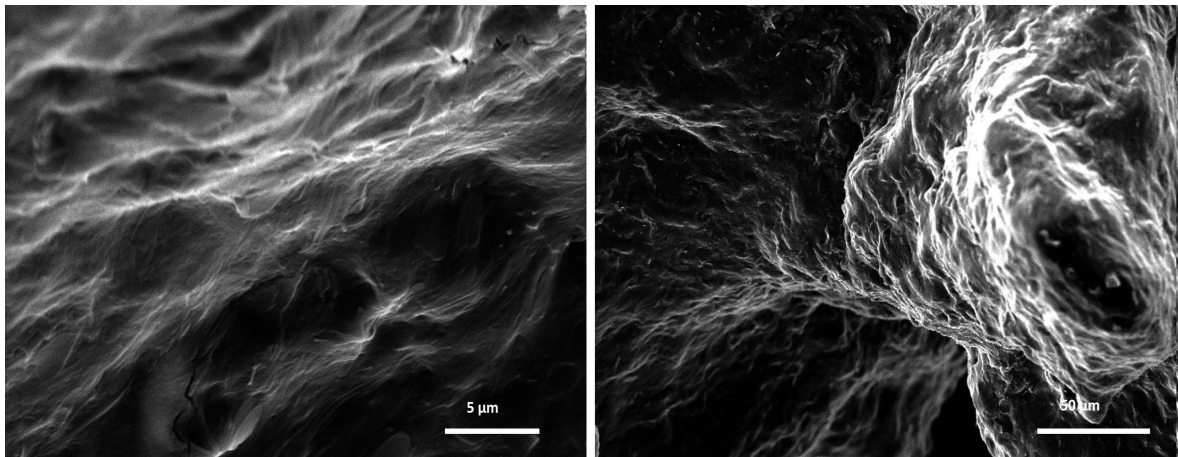
- [94] J. Wu, J. Zhang, H. Zhang, J. He, Q. Ren, and M. Guo, "Homogeneous acetylation of cellulose in a new ionic liquid," *Biomacromolecules*, vol. 5, no. 2, pp. 266–268, 2004.



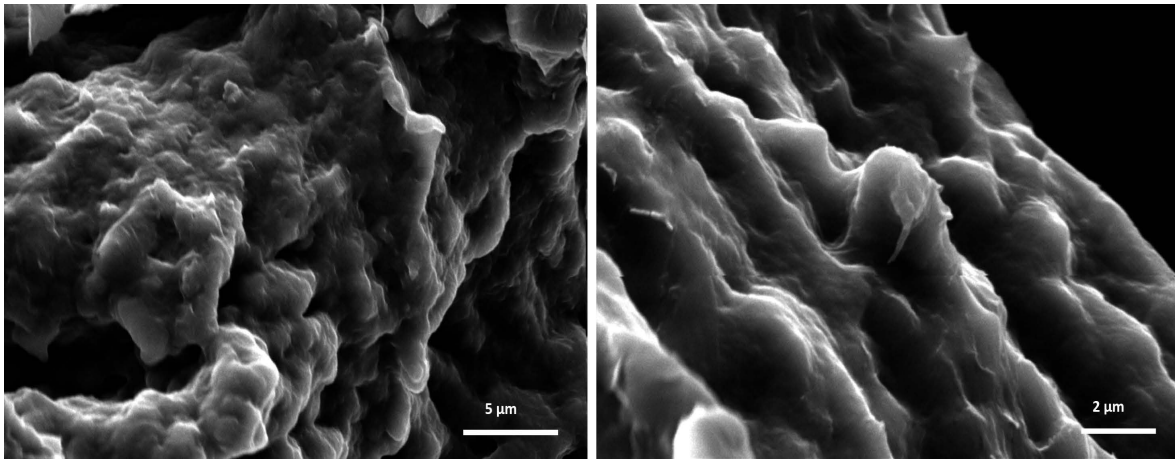
## Apêndice A - SEM



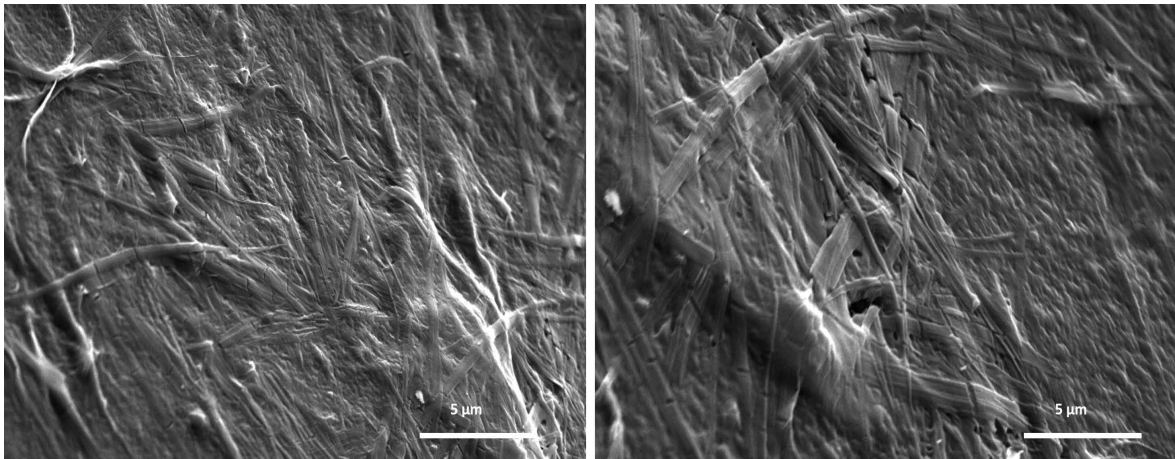
**Figura A1:** SEM da superfície da CB (superfície de secagem).



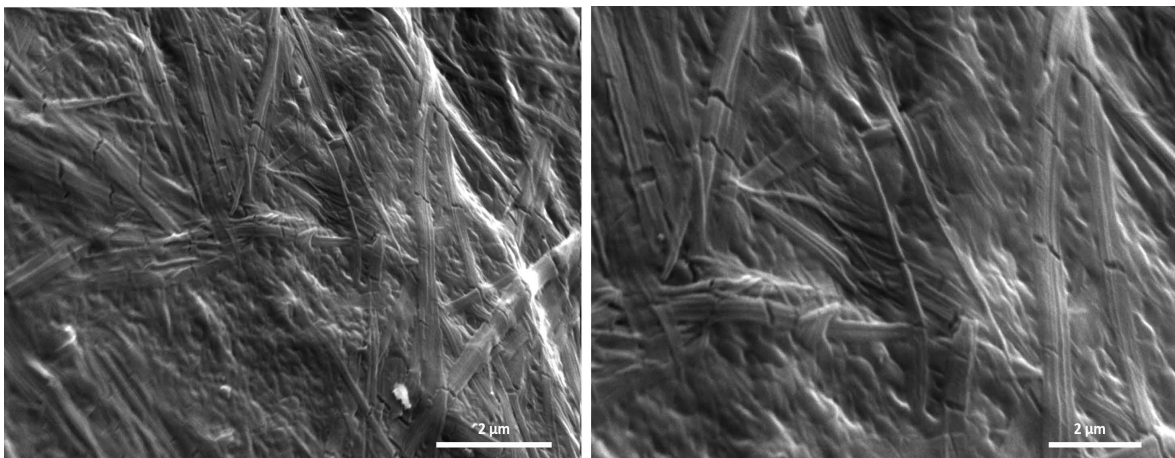
**Figura A2:** SEM da superfície da CB (superfície de secagem).



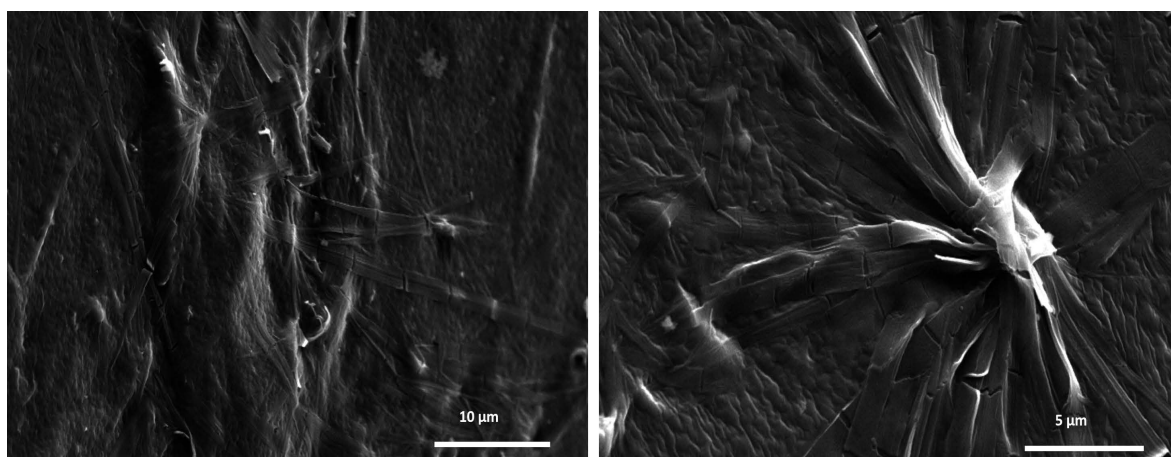
**Figura A3:** SEM da superfície da CB (superfície de secagem).



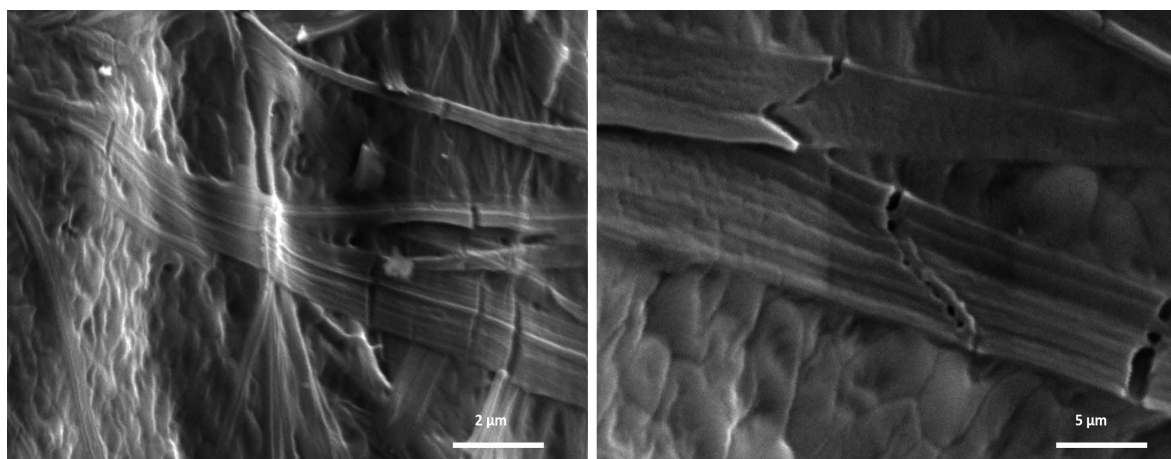
**Figura A4:** Morfologia da superfície da CB numa zona de fratura.



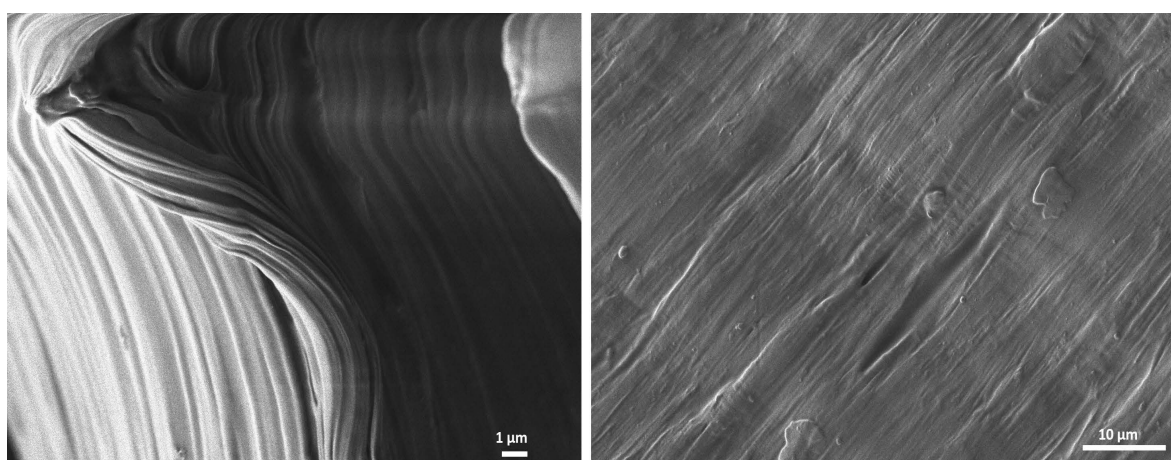
**Figura A5:** Morfologia da superfície da CB numa zona de fratura.



**Figura A6:** Morfologia da superfície da CB numa zona de fratura.



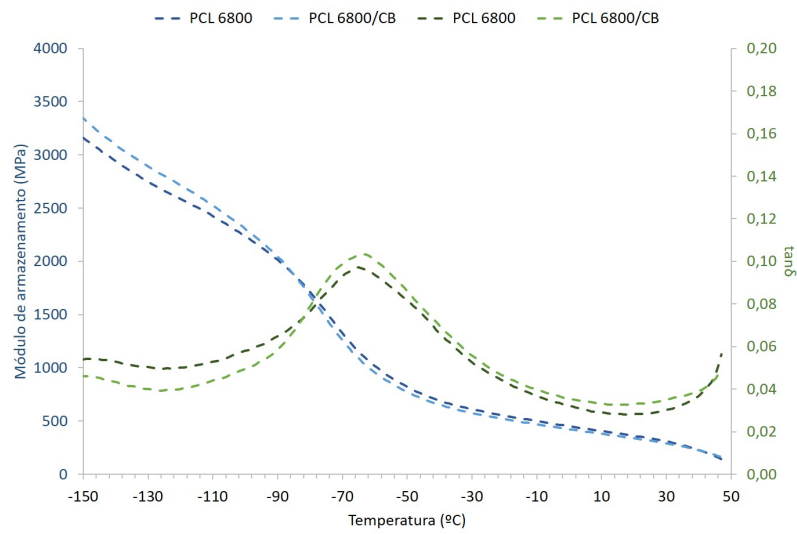
**Figura A7:** Morfologia da superfície da CB numa zona de fratura.



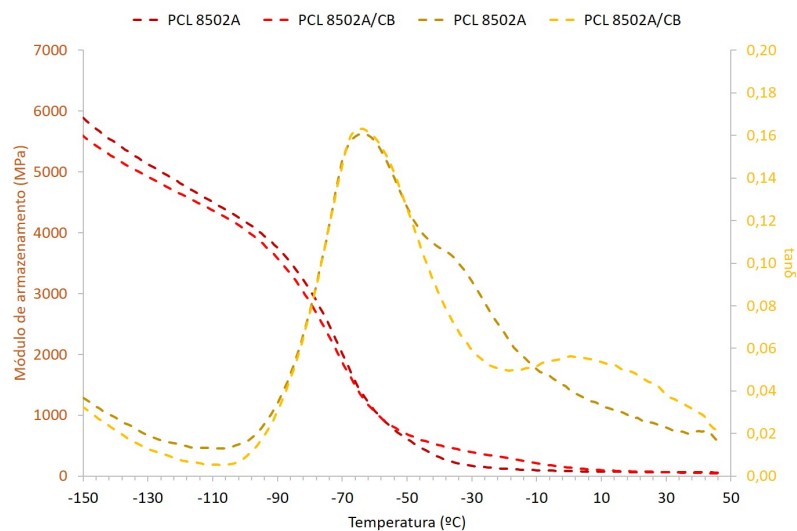
**Figura A8:** Morfologia do compósito PCL 6800/CB após ensaio de tração uniaxial.



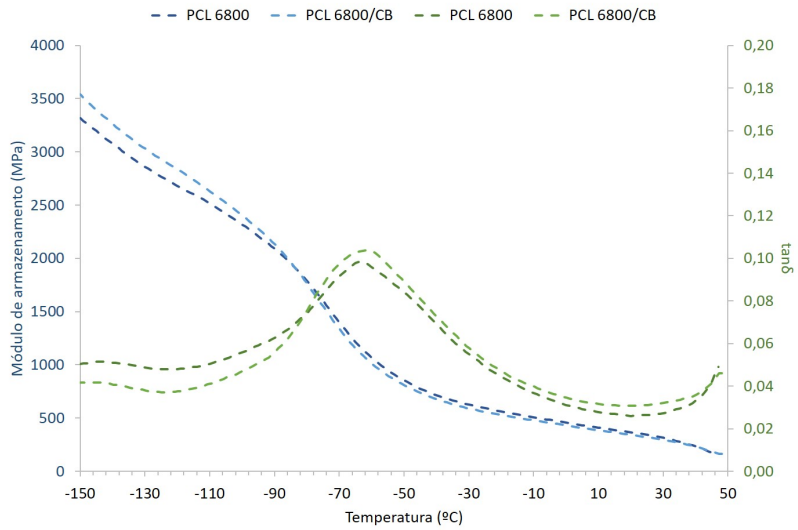
# Apêndice B - DMTA



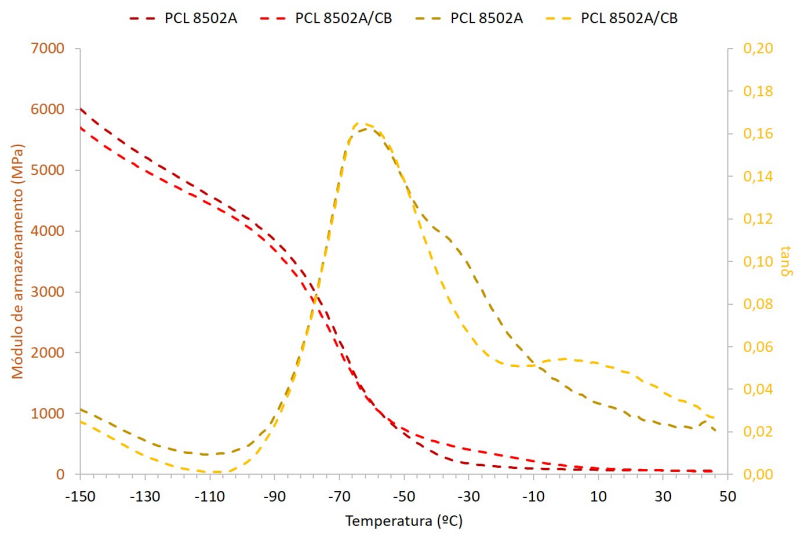
**Figura B1:** Curva de DMTA da PCL 6800 e respectivo compósito (Frequência=2Hz).



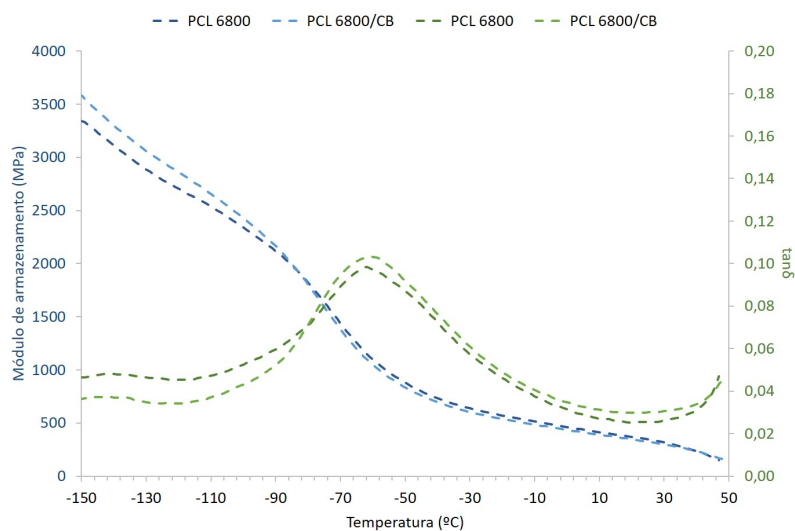
**Figura B2:** Curva de DMTA da PCL 8502A e respectivo compósito (Frequência=2Hz).



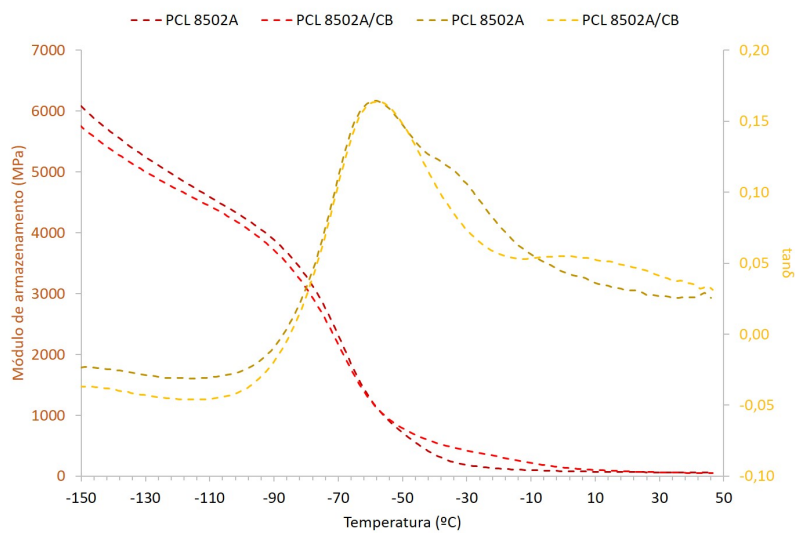
**Figura B3:** Curva de DMTA da PCL 6800 e respectivo compósito (Frequência=5Hz).



**Figura B4:** Curva de DMTA da PCL 8502A e respectivo compósito (Frequência=5Hz).



**Figura B5:** Curva de DMTA da PCL 6800 e respectivo compósito (Frequência=10Hz).



**Figura B6:** Curva de DMTA da PCL 8502A e respectivo compósito (Frequência=10Hz).





# Anexo A - Ficha ICDD

## Name and formula

Reference code: 00-003-0289  
PDF index name: Native cellulose  
Chemical formula:  $(C_6H_{12}O_6)_x$

## Crystallographic parameters

Crystal system: Monoclinic

a (Å): 8.3500  
b (Å): 10.2800  
c (Å): 7.9600  
Alpha (°): 90.0000  
Beta (°): 102.0000  
Gamma (°): 90.0000

Measured density (g/cm<sup>3</sup>): 1.60  
Volume cell (10<sup>6</sup> pm<sup>3</sup>): 668.34

RIR: -

## Subfiles and Quality

Subfiles: Organic  
Forensic  
Polymer  
Quality: Doubtful (O)

**Comments**

General comments: Volume of the unit cell = 668 Å<sup>3</sup>

Reflections obtained from fiber diagram with uncertainty in intensity ratios.

Reason "O"quality: O assigned because average D2q is 0.058

**References**

Primary reference: Andress., *Z. Phys. Chem (Leipzig)*, **136**, 279,(1928)

**Peak list**

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta [deg]	I [%]
1	-1	0	1	6.28000	14.091	20.0
2				5.94000	14.902	80.0
3	-1	1	1	5.37000	16.494	70.0
4	1	0	1	5.11000	17.340	20.0
5	0	2	1	4.30000	20.634	60.0
6	0	0	2	3.89000	22.842	100.0
7	1	3	0	3.16000	28.218	40.0
8	-1	2	2	3.07000	29.063	40.0
9				2.94000	30.378	40.0
10	1	3	1	2.86000	31.249	40.0
11	3	1	0	2.63000	34.062	60.0
12	-2	3	1	2.59000	34.605	40.0
13	0	4	0	2.57000	34.882	80.0
14	-2	3	2	2.33000	38.610	40.0
15	2	4	0	2.17000	41.584	60.0
16	1	2	3	2.12000	42.612	20.0
17	3	0	2	2.04000	44.370	20.0
18	-4	1	2	1.95000	46.535	40.0

## Stick Pattern

