

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

Amanda Maria Claro

PLATAFORMA MULTIFUNCIONAL BASEADA EM CELULOSE BACTERIANA
PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Araraquara

2019

Amanda Maria Claro

PLATAFORMA MULTIFUNCIONAL BASEADA EM CELULOSE BACTERIANA
PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

Coorientador: Dr. Gustavo Claro Monteiro

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

C547p Claro, Amanda Maria

Plataforma multifuncional baseada em celulose bacteriana para aplicações biomédicas/Amanda Maria Claro. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2020.
87f.

Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud
Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Claro Monteiro

1. Celulose bacteriana. 2. Silano. 3. Mercapto. 4. Cultura celular.
5. Nanopartículas de ouro. 6. Cisteína. I. Título.

CDU 577.1:66



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA REGENERATIVA
E QUÍMICA MEDICINAL – PPGB-MRQM




AMANDA MARIA CLARO

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 04 de dezembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD (Orientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA


Prof. Dr. CESAR AUGUSTO TISCHER
Universidade de Londrina/UEL


Profª Drª ROSANA MARIA NASCIMENTO DE ASSUNÇÃO
Universidade Federal de Uberlândia – Campus de Pontal.

Amanda Maria Claro

Graduada no curso Bacharelado em Química Tecnológica na instituição Universidade Federal de São Carlos - UFSCar. Estagiária no Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (UNESP Araraquara) de agosto de 2016 a janeiro de 2017. Bolsista do Programa Ciência Sem Fronteiras de junho de 2014 a agosto de 2015 (DePaul University, Chicago). Estudante de iniciação científica no Laboratório de Química Bio-Orgânica (UFSCar São Carlos) de abril de 2012 a maio de 2014. Bolsista TT-3 FAPESP junto a empresa Genotyping - Laboratório de Biotecnologia de Março de 2018 a outubro de 2019. Atualmente mestranda em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal na instituição Universidade de Araraquara – UNIARA

Formação Acadêmica

- 2018** Mestrado em Biotecnologia.
Universidade de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil
Título: Plataforma Multifuncional Baseada em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas

Orientador: Hernane da Silva Barud
Coorientador: Gustavo Claro Monteiro
- 2011 - 2017** Graduação em Química.
Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil
com período sanduíche de 2014-2015 em DePaul University, Chicago, Estados Unidos
Bolsista Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Orientador UFSCar: Timothy John Brocksom
Orientador DePaul University: Gregory B. Kharas
- 2007 - 2010** Ensino Médio
ETEC Professora Anna de Oliveira Ferraz, ETEC, Brasil

Produção Bibliográfica

1. AZEREDO, H. M.; BARUD, H. S.; FARINAS, C. S.; VASCONCELLOS, V. M.; **CLARO, A. M.** Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2019.
2. KHARAS, G. B.; **CLARO, A. M.**; GAO, Y.; BHANOT, J. S.; BOSEK, P.; CORWIN, T. R.; GIDEON, C. J.; FITZPATRICK, P. R.; FLORES, I. M.; RICKTER, J. M. Novel copolymers of styrene. 1. Alkyl ring-substituted propyl 2-cyano-3-phenyl-2-propenoates. *Journal of Macromolecular Science Part A-Pure and Applied Chemistry*. 2016.
3. KHARAS, G. B.; GAO, Y.; **CLARA, A. M.**; CURTIS, V. J.; SOARES, R. S. B.; DUGAN, B.; DUNCAN, C. E.; GLUZMAN, E. R.; GOMEZ, N.; KAWARSKI, M. Y.; KESTIN, D. M. Novel copolymers of styrene. 13. Methyl and methoxy ring-trisubstituted butyl 2-cyano-3-phenyl-2-propenoates. *Journal of Macromolecular Science Part A-Pure and Applied Chemistry*. 2016.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hernane da Silva Barud, pela amizade, pela dedicação e por me orientar neste trabalho e me permitir realizá-lo.

Ao Dr. Gustavo Claro Monteiro, pela amizade e por ter contribuído imensamente no desenvolvimento deste trabalho.

À Empresa NEXFILL, pelo fornecimento das membranas de celulose bacteriana.

À Empresa Genotyping, pela parceria.

Ao Dr. Caio Gomide Otoni e ao CNPEM, pelas análises de XPS.

Ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho e à Profa. Dra. Sandra Cruz, pelas discussões e sugestões na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Caio Paranhos e aos membros do grupo LabPol Robert Paiva e Luíza Melchert Bozzo, pelas medidas de ângulo de contato.

Ao Me. Rafael Pupin, pelos ensinamentos com a preparação das nanopartículas.

À Nadia Andrade Aleixo, pelo auxílio com os ensaios biológicos.

À Prof. Dra. Mônica Rosas da Costa Lemma, pela colaboração com as discussões dos dados extraídos dos ensaios biológicos.

Aos membros do grupo BioPolMat, que contribuíram direta e indiretamente para este trabalho, em especial à Nayara Cavichioli do Amaral por todo auxílio e dedicação.

Agradeço à Universidade de Araraquara – UNIARA e a todos os servidores da instituição.

Aos meus familiares, em particular aos meus pais Ana Maria e Edgard, pelo apoio.

À FAPESP, pela bolsa concedida.

Em especial à Deus, pelo dom da vida e por me amar especialmente.

“A scientific discovery is also a religious discovery. There is no conflict between science and religion. Our knowledge of God is made larger with every discovery we make about the world.”

Joseph H. Taylor, Jr

RESUMO

A celulose é um material versátil que encontra aplicação na área biomédica enquanto substrato para cultivo celular e para sensores capazes de detectar e monitorar diversas biomoléculas. Contudo, poucos estudos têm explorado o emprego da celulose bacteriana (CB), um *nanopaper* com propriedades distintas, como plataforma para a produção de tais dispositivos. No presente trabalho, membranas de CB foram funcionalizadas com grupo tiol (SH) via silanização com (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (MPTMS) sob diferentes condições, a fim de se obter uma plataforma com propriedades melhoradas de adesão celular. Em paralelo, diversas condições reacionais foram testadas a fim de se produzir nanopartículas de ouro funcionalizadas com L-cisteína (L-Cys-AuNPs) para a confecção de um biossensor suportado em CB. Os seguintes parâmetros foram avaliados quanto à eficiência da funcionalização da CB com MPTMS: concentração do silano (0,538, 0,164, 0,135, 0,043 e 0,034 mmolL⁻¹), solvente (água, acetona e mistura de etanol e água), método de secagem (temperatura ambiente e temperatura de cura à 120 °C) e emprego de catalisador (ácido clorídrico, hidróxido de sódio e hidróxido de amônio). Os resultados do conjunto de análises realizadas – FTIR, TGA, análise elementar, ângulo de contato e MEV - indicam que a funcionalização da superfície da CB foi eficiente quando empregadas as reações catalisadas por HCl e NaOH bem como por NH₄OH, independentemente do método de secagem, de forma que as membranas submetidas a estes tratamentos apresentaram teor de enxofre de 3 à 5 vezes maior em relação à CB nativa. O ensaio biológico realizado com células normais/saudáveis GM07492 revelou que a adesão de células à superfície da CB depende não apenas do grupo funcional presente na matriz, mas também de outras variáveis haja visto que houve amostras funcionalizadas que favoreceram a aderência celular enquanto outras a prejudicaram. As AuNPs e as L-Cys-AuNPs - sintetizadas em duas diferentes condições - foram produzidas empregando-se citrato de sódio como agente redutor e caracterizadas por UV-Vis, MET e DLS. Na análise de UV-Vis, as AuNPs apresentaram banda de absorção em 525 nm, a qual foi deslocada para 550 nm no caso das L-Cys-AuNPs. As imagens de MET revelaram que as AuNPs apresentaram diâmetro de 24,0 ± 4,2 nm enquanto o diâmetro das L-Cys-AuNPs foi determinado em 20,2 ± 3,3 nm (condição 1) e em 21,5 ± 4,1 nm (condição 5). Ainda, os resultados de DLS revelaram que as AuNPs se mostraram mais ou igualmente estáveis em relação às L-Cys-AuNPs.

Palavras-chave: celulose bacteriana, silano, mercapto, cultura celular, nanopartículas de ouro, cisteína.

ABSTRACT

Cellulose is a versatile material that finds application in the biomedical field as substrate for cell culture and for sensors applied in detection and monitoring of a diverse range of biomolecules. However, few studies have been done to explore the use of bacterial cellulose (BC), a nanopaper with distinct properties, as a platform for the production of such devices. In the present work, BC membranes have been functionalized with thiol functional group (SH) through silanization reaction with (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPTMS) under different conditions, in order to obtain a platform with improved cell adhesion. In parallel, several reaction conditions were tested in order to produce L-cysteine-functionalized gold nanoparticles (L-Cys-AuNPs) for making a biosensor supported in BC. The efficiency of BC surface modification with MPTMS was evaluated by the following parameters: silane concentration (0,538, 0,164, 0,135, 0,043 e 0,034 mmolmL⁻¹), solvent (water, acetone and a mixture of ethanol and water) and drying method (room temperature and at 120 °C as curing temperature), and use of catalyst (hydrochloric acid, sodium hydroxide and ammonium hydroxide). The results of the set of analyzes performed - FTIR, TGA, elemental analysis, contact angle and SEM - indicate that BC surface functionalization was efficient when reactions were catalyzed by HCl and NaOH as well as by NH₄OH, regardless the drying process, thereby the samples submitted to these treatments exhibit sulfur content of 3 to 5 times higher than native BC. The performed biological assay with normal/healthy GM07492 cells revealed that cell adhesion to the surface of BC depends not only on the functional group present at the matrix, but also on other variables once there were functionalized samples that favored cell adhesion while others reduced it. AuNPs and L-Cys-AuNPs - synthesized under two different conditions - were successfully prepared using sodium citrate as reducing agent and they were characterized by UV-Vis, TEM and DLS. UV-Vis spectra demonstrated that AuNPs presented an absorption band at 525 nm, which shifted to 550 nm for the L-Cys-AuNPs. TEM images revealed that the AuNPs showed an average diameter of 24.0 ± 4.2, while the L-Cys-AuNPs showed an average diameter of 20.2 ± 3.3 nm (condition 1) and 21.5 ± 4,1 nm (condition 5). Moreover, DLS results revealed that AuNPs were more or as stable as the L-Cys-AuNPs.

Key words: bacterial cellulose, silane, mercapto, cell culture, gold nanoparticles, cysteine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da rede 3-D secretada pela bactéria <i>Gluconacetobacter xylinum</i> .	18
Figura 2. Estrutura química da celulose.	19
Figura 3. Aplicações biomédicas da plataforma de cultura celular baseada em papel. A modificação das propriedades físicas e químicas do papel permite que ele seja utilizado em cultura de células e controle de nutrientes e difusão de oxigênio, mimetizando o ambiente <i>in vivo</i> saudável e afetado por patologia (modelo patológico). Plataformas para cultura de células também podem ser aplicadas em estudo de interação célula-fármaco para triagem de drogas e na criopreservação de células.	21
Figura 4. Esquema reacional da preparação da celulose bacteriana modificada.	23
Figura 5. Mecanismo de hidrólise em meio ácido.	23
Figura 6. Mecanismo de hidrólise em meio básico.	24
Figura 7. Mecanismo de condensação.	24
Figura 8. Espectro vibracional na região do infravermelho das membranas de CB nativa e modificadas via Métodos A e B.	32
Figura 9. Curvas de TG e DTG da CB sob atmosfera de ar sintético.	33
Figura 10. Curvas de TG e DTG das membranas de CB modificadas via Método A, sob atmosfera de ar sintético.	34
Figura 11. Curvas de TG e DTG das membranas CB-C1 modificadas via Método B secas à T.A. e à 120 °C, sob atmosfera de ar sintético.	35
Figura 12. Espectro de XPS no modo <i>survey</i> da amostra (a) CB (b) CBSH-AC1-T.A. (c) CBSH-AC4-T.A (d) CBSH-AC16-T.A (e) CBSH-BC1-T.A. (f) CBSH-BC1-120 °C.	38
Figura 13. Análises morfológicas por MEV da superfície da amostra de CB.	40
Figura 14. Análises morfológicas por MEV da superfície da amostra CBSH-AC1-T.A.	40
Figura 15. Análises morfológicas por MEV da superfície da amostra CBSH-AC4-T.A.	40
Figura 16. Análises morfológicas por MEV da superfície da amostra CBSH-AC16-T.A.	41
Figura 17. Análises morfológicas por MEV da superfície da amostra CBSH-BC1-T.A.	41
Figura 18. Análises morfológicas por MEV da superfície da amostra CBSH-BC1-120 °C.	41

Figura 19. Espectro vibracional na região do infravermelho das membranas de CB nativa e modificadas via Métodos C e D.....	43
Figura 20. Curvas de TG e DTG das membranas modificadas via Método C e secas à T.A. e à 120 °C, sob atmosfera de ar sintético.....	44
Figura 21. Curvas de TG e DTG das membranas modificadas via Método D e secas à T.A. e à 120 °C, sob atmosfera de ar sintético.....	44
Figura 22. Representação dos vetores das tensões interfaciais, onde γ_{SL} =, sólido-líquido, γ_{SV} = sólido-vapor e γ_{LV} = líquido-vapor.....	46
Figura 23. Gráfico dos valores de AC entre gotas de água e diiodometano e membranas CB Nativa e modificadas via Métodos C e D.	49
Figura 24. Análises morfológicas por MEV da superfície das amostras (A) CBSH-CC12-T.A. e (B) CBSH-CC12-120 °C.....	50
Figura 25. Análises morfológicas por MEV da superfície das amostras (A) CBSH-DC3-T.A. e (B) CBSH-DC3-120 °C.....	50
Figura 26. Fotos das células aderidas (A) ao fundo placa de cultura celular; (B) à membrana de CB; (C) à amostra CBSH-CC12-T.A. (D) à amostra CBSH-CC12-120 °C; (E) à amostra CBSH-DC3-T.A. e (F) à amostra CBSH-DC3-120 °C.	51
Figura 27. Gráfico de viabilidade celular em 24 e 48 horas, onde o asterisco indica diferença estatística significativa para o mesmo grupo.	52
Figura 28. Representação esquemática do efeito LSPR para uma AuNP. Quando o diâmetro da partícula é muito menor que o comprimento de onda da luz incidente (por exemplo, uma partícula de 10 nm de diâmetro, luz visível), um dipolo elétrico é gerado em sua superfície.	57
Figura 29. Espectro UV-vis e solução coloidal das AuNPs.	63
Figura 30. Imagem obtida por MET das AuNPs tomando-se por referência a barra com escala de 200 nm.	64
Figura 31. Histograma de distribuição do diâmetro das AuNPs sintetizadas.....	64
Figura 32. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das AuNPs.	65
Figura 33. Imagem de MEV das AuNPs aderidas à superfície da CB nativa.....	66
Figura 34. Espectro UV-vis e solução coloidal das partículas – Condição 1.	67
Figura 35. Espectro UV-vis e solução coloidal das partículas – Condição 2.	67
Figura 36. Espectro UV-vis e solução coloidal das partículas – Condição 3.	68
Figura 37. Espectro UV-vis e solução coloidal das partículas – Condição 4.	68
Figura 38. Espectro UV-vis e solução coloidal das partículas – Condição 5.	69

Figura 39. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das partículas – Condição 1.....	70
Figura 40. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das partículas – Condição 2.....	70
Figura 41. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das partículas – Condição 3.....	71
Figura 42. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das partículas – Condição 4.....	71
Figura 43. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das partículas – Condição 5.....	72
Figura 44. Imagem obtida por MET das NPs tomando-se por referência barras com escala de 100 nm e 50 nm - Condição 1.	74
Figura 45. Imagem obtida por MET das NPs tomando-se por referência barras com escala de 100 nm e 50 nm - Condição 5.	75
Figura 46. Histograma de distribuição do diâmetro das L-Cys-AuNPs sintetizadas – Condição 1.	76
Figura 47. Histograma de distribuição do diâmetro das L-Cys-AuNPs sintetizadas – Condição 5.	76
Figura 48. Histograma de distribuição do diâmetro do núcleo inorgânico das L-Cys- AuNPs sintetizadas –Condição 5.....	77
Figura 49. Protótipo de plataforma baseada em CB.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de perda de massa dos eventos térmicos e temperatura de <i>onset</i> do primeiro evento de degradação das amostras de CB Nativa e modificadas via Métodos A e B.	35
Tabela 2. Teor de C, H, N e S das amostras de CB Nativa e modificadas via Métodos A e B à T.A.	36
Tabela 3. Porcentagem de perda de massa dos eventos térmicos e T_{onset} do primeiro evento de degradação das amostras de CB Nativa e modificadas via Métodos C e D.	45
Tabela 4. Teor de C, H, N e S das amostras de CB Nativa e modificadas via Métodos C e D.	45
Tabela 5. Valores das medidas de AC entre gotas de água e diiodometano e amostras CB Nativa e modificadas via Métodos C e D.	48
Tabela 6. Condições reacionais de síntese e resultados das análises das NPs.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AC - Ângulo de contato

APTES - (3-aminopropil)trimetoxissilano

Au - Ouro

AuNPs - Nanopartículas de Ouro

CB - Celulose Bacteriana

Cys - Cisteína

DLS - Espalhamento Dinâmico de Luz (do inglês *Dynamic Light Scattering*)

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial (do inglês *Differential Scanning Calorimetry*)

DTG - Termogravimetria Derivada (do inglês *Derivative Thermogravimetric*)

FTIR-ATR - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho por Reflectância Total Atenuada (do inglês *Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance*)

HAuCl₄ - ácido tetracloroáurico

L-Cys-AuNPs - Nanopartículas de Ouro Funcionalizadas com L-Cisteína

LSPR - Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado (do inglês *Localized Surface Plasmon Resonance*)

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MPTMS - (3-mercaptopropil)trimetoxissilano

NPs - Nanopartículas

RGD - sequência tripeptídica Arg-Gly-Asp

TGA - Análise Termogravimétrica (do inglês *Thermogravimetric Analysis*)

T_{endset} - Temperatura de *Endset*

T_{onset} - Temperatura de *Onset*

T_{pico} - Temperatura de *Pico*

UV - Ultravioleta

UV-Vis - Ultravioleta na Região do Visível

XPS - Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X (do inglês *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*)

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

SUMÁRIO

Capítulo 1: Plataforma para Cultivo Celular	17
1. Introdução.....	17
1.1 Aspectos Gerais	17
1.2 Celulose Bacteriana	17
1.2.1 Biossíntese e Propriedades	18
1.3 Cultura de Células.....	20
1.3.1 Aplicações da Celulose como Plataforma para Cultivo de Células.....	20
1.3.2 Modificação da Superfície da CB para Aplicação em Cultivo Celular	21
1.3.2.1 Reação de Silanização	22
2. Objetivos.....	25
2.1 Objetivos Gerais	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3. Materiais e Métodos	26
3.1 Obtenção da Celulose Bacteriana.....	26
3.2 Preparação das Membranas de CB Modificadas.....	26
3.2.1 Método A – Silanização em Acetona	27
3.2.2 Método B – Silanização em Etanol e Água 9:1	27
3.2.3 Método C – Silanização Catalisada em Solução Aquosa	27
3.2.4 Método D – Silanização Catalisada em Etanol e Água 10:1	28
3.3 Ensaios Biológicos.....	28
3.4 Técnicas Empregadas na Caracterização dos Materiais	29
a) Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho	29
b) Análise Termogravimétrica	29
e) Microscopia Eletrônica de Varredura	30

f) Ângulo de Contato	30
g) Espectroscopia de Fluorescência	30
4. Resultados.....	31
4.1 Caracterização das Plataformas Baseadas em CB produzidas via Método A (Silanização em Acetona) e Método B (Silanização em Etanol e Água 9:1).....	31
4.2 Caracterização das Plataformas Baseadas em CB produzidas via Método C (Silanização Catalisada em Solução Aquosa) e Método D (Silanização Catalisada em Etanol e Água 10:1)	42
4.3 Ensaio Biológico das Plataformas Baseadas em CB produzidas via Métodos C e D.....	51
5. Conclusões do Capítulo.....	54
6. Perspectivas	55
Capítulo 2: Plataforma Sensora	56
1. Introdução.....	56
1.1 Sensores Colorimétricos Baseados em AuNPs	56
1.1.1 Efeito da Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado	56
1.1.2 Funcionalização das AuNPs	57
1.1.3 Biossensores Baseados em AuNPs para Detecção de Biomoléculas Suportados em Matriz Polimétrica.....	58
2. Objetivos	59
2.1 Objetivos Gerais	59
2.2 Objetivos Específicos	59
3. Materiais e Métodos	60
3.1 Preparação das AuNPs	60
3.2 Preparação das L-Cys-AuNPs.....	60
3.3 Técnicas Empregadas na Caracterização dos Materiais	62
4. Resultados.....	63
4.1 Caracterização das AuNPs.....	63

4.2 Caracterização das L-Cys-AuNPs.....	66
4.3 Protótipo de Plataforma Baseada em CB	78
5. Conclusões do Capítulo.....	79
6. Perspectivas	80
Conclusões Finais	81
Referências Bibliográficas.....	82

Capítulo 1: Plataforma para Cultivo Celular

1. Introdução

1.1 Aspectos Gerais

O papel, uma das invenções mais antigas da humanidade, é um material versátil composto essencialmente por celulose que vem sendo utilizado há séculos não apenas como suporte para escrita, mas para uma variedade de finalidades, como embalagens, produtos sanitários e cédulas ^[1]. A celulose pode ser sintetizada por alguns microrganismos como algas, fungos e algumas bactérias, apresentando neste caso uma estrutura distinta de nanofios que se arranjam aleatoriamente ao longo de todo o material ^[2].

Recentemente, tem havido um interesse crescente da comunidade científica em utilizar substrato celulósico como suporte para o cultivo de células ^[1,3-5], o qual pode ser empregado na cultura de diversas linhagens. Este tipo de dispositivo, que passou a ser explorado a partir de 2009 ^[6], pode ser utilizado no monitoramento de respostas celulares, bem como na investigação *in vitro* da fisiologia e da fisiopatologia de células e tecidos ^[4].

Substratos celulósicos encontram vasta aplicação enquanto suporte para testes diagnósticos de baixo custo e ecologicamente corretos. Testes diagnósticos baseados em papel têm sido usados na detecção de biomoléculas de diversos tamanhos, e assim esses sensores têm sido empregados no diagnóstico de patologias como a infecção pelo vírus HIV (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*) ^[4], bem como no monitoramento domiciliar de metabólitos como glicose e colesterol, por exemplo. Para se ter uma ideia da relevância que estes dispositivos desempenham na economia, estima-se que o mercado mundial de sensores deva crescer a uma taxa anual superior à 10%, chegando a US\$ 20 bilhões (aproximadamente 75 bilhões de reais) em 2020 ^[7].

As propriedades distintas da celulose bacteriana (CB) em relação à celulose vegetal e as inúmeras possibilidades de manipulação destas propriedades, conforme será tratado, visando seu emprego enquanto plataforma de cultivo celular e sensora, é tema central da presente dissertação.

1.2 Celulose Bacteriana

A celulose, biopolímero mais abundante na Terra, é formada pela união de moléculas de glicose por meio de ligações β -1,4-glicosídicas. A celulose também

pode ser sintetizada por bactérias gram-negativas *Gluconacetobacter* (gênero renomeado recentemente como *Komagataeibacter*), bem como por cepas de *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligene*, *Aerobacter* e *Azotobacter*. A bactéria *Gluconacetobacter xylinum*, entretanto, descrita pela primeira vez por Brown em 1886 que a identificou em caldo de fermentação do vinagre, produz celulose com maior eficiência. A CB comparada à celulose vegetal, é obtida pura quimicamente, livre de lignina, hemicelulose e demais subprodutos obtidos junto a celulose advinda de fonte vegetal e que exigem tratamento para sua remoção [8-11]. A **Figura 1** ilustra a rede tridimensional de fibras de celulose secretada por bactéria.

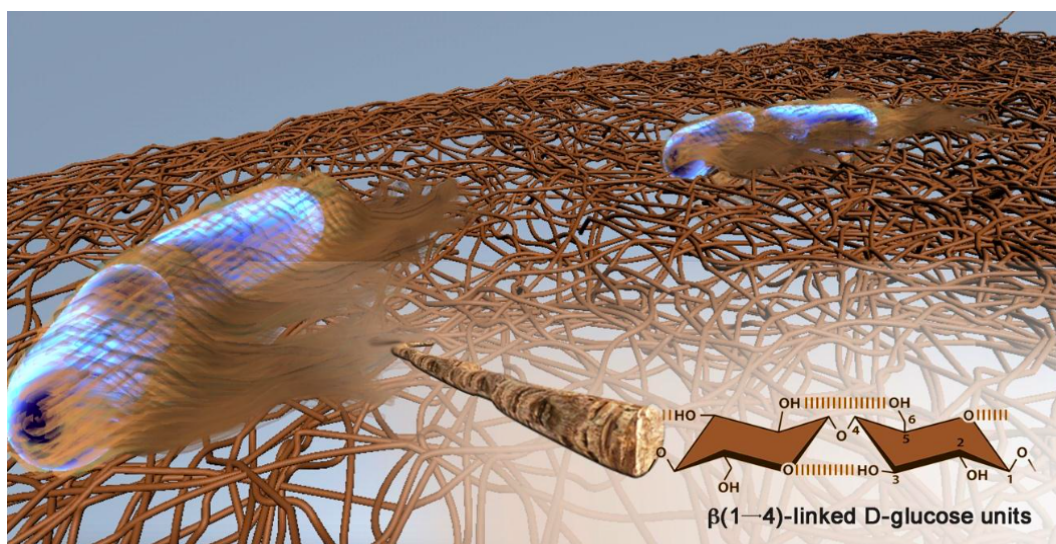


Figura 1. Esquema representativo da rede 3-D secretada pela bactéria *Gluconacetobacter xylinum*.

Fonte: DE OLIVEIRA BARUD, H. et al. (2016) [9].

1.2.1 Biossíntese e Propriedades

A produção da CB pode ser realizada em laboratório utilizando cultivos em meios sólidos e em meios líquidos, em cultura estática ou agitada, sendo facilmente moldável durante o processo. O meio de cultivo consiste basicamente de uma ou mais fontes de carboidrato, como glicose e sacarose, além de extrato de levedura como fonte de nitrogênio [12].

A CB é constituída por uma rede tridimensional aleatória de fibras com menos de 100 nm de largura e diâmetro que varia de 2 a 4 nm [9,10] e assim pode ser considerada um *nanopaper*. A morfologia de suas nanofibrilas se assemelha às nanofibrilas de colágeno presentes em tecidos naturais como o cordão umbilical e a membrana que reveste a córnea [13].

A celulose apresenta três grupos hidroxila acessíveis por unidade de glicose^[8], os quais interagem entre si por meio de ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares. A celulose conta ainda com interações hidrofóbicas e de van der Waals, formando cadeias paralelas^[14], conforme se observa na **Figura 2**. Considerando a forte interação entre os grupos hidroxila disponíveis e devido ao tamanho reduzido do diâmetro das fibras, a CB apresenta uma estrutura coesa, área superficial elevada e exibe propriedades mecânicas pertinentes à área médica, com um comportamento de tensão-deformação que se assemelha ao apresentado por tecidos moles^[15].

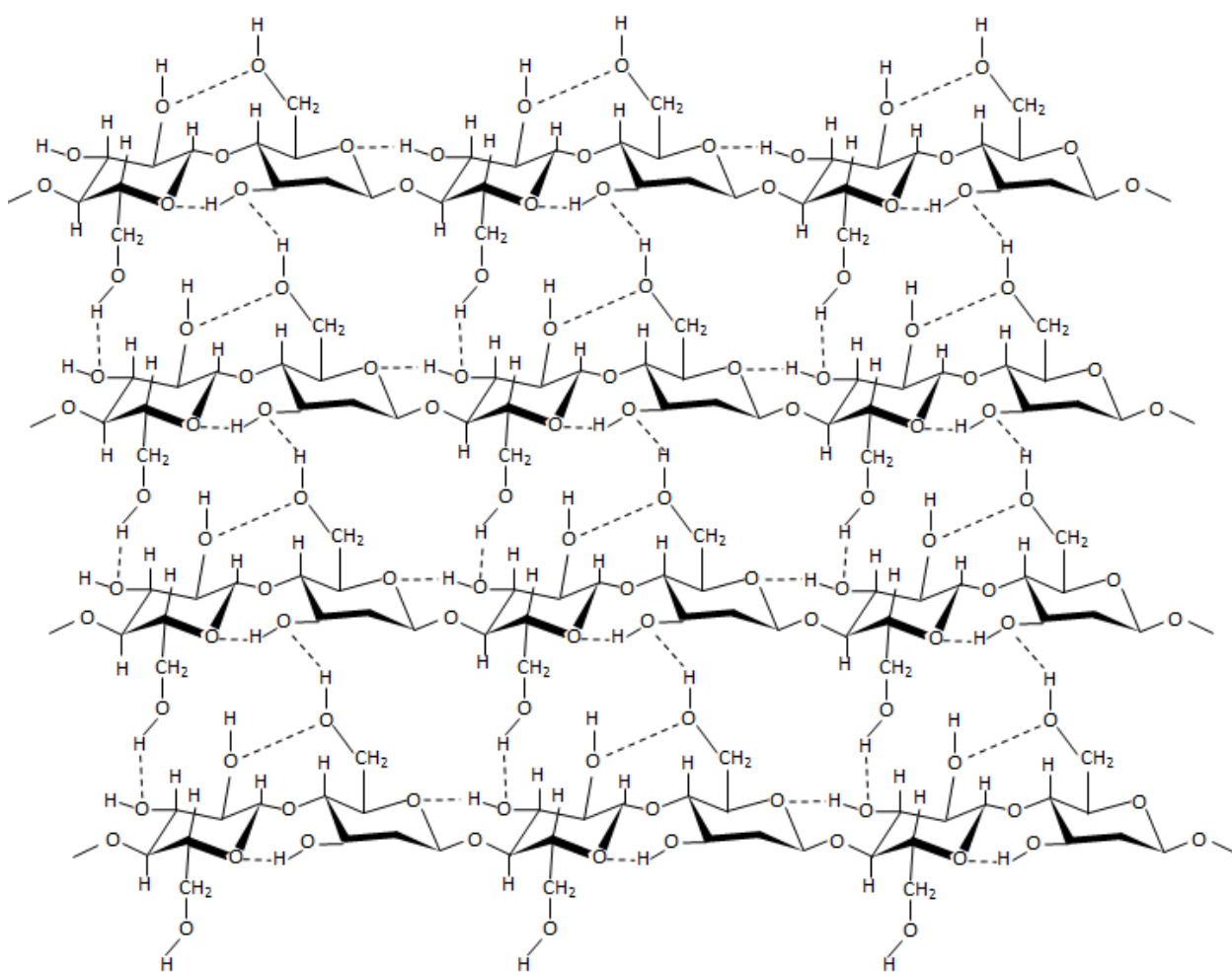


Figura 2. Estrutura química da celulose.

Fonte: WILTON, R. L. et al. (2015)^[16].

Devido a sua morfologia distinta, a CB apresenta características únicas: alta pureza e alta cristalinidade (entre 70 e 80%), boa estabilidade química e alta capacidade de retenção de água (teor superior a 90%). Além disto, a CB é biocompatível, passível de ser produzida em larga escala^[10,13], exige mínimo

processamento e apresenta boas propriedades mecânicas. Por fim, a CB pode sofrer uma grande variedade de modificações químicas, sendo portanto um polímero natural com propriedades promissoras para a aplicação em cultivo celular^[8].

1.3 Cultura de Células

A cultura de células *in vitro* fornece uma plataforma definida para se investigar a fisiologia e a fisiopatologia celular e tecidual fora do organismo. Idealmente, o material a ser utilizado como plataforma para cultura de células deve ser biocompatível, biodegradável e apresentar arquitetura tridimensional semelhante à matriz extracelular por meio da presença de fibrilas entrelaçadas. Além disso, deve apresentar boa capacidade de absorção de fluidos e assim, permitir difusão adequada de oxigênio, nutrientes e produtos residuais, promovendo adesão celular e permitindo a distribuição uniforme de células sobre sua superfície^[1,4]. Neste contexto, a CB que satisfaz estes requisitos, apresenta-se como uma matriz promissora a ser empregada enquanto suporte para este tipo de plataforma.

1.3.1 Aplicações da Celulose como Plataforma para Cultivo de Células

Folhas de papel contendo diferentes cultivos de células podem ser empilhadas em distribuição espacial definida para simular a arquitetura tridimensional nativa de sistemas *in vivo*. Este tipo de dispositivo pode ser utilizado como modelo *in vitro* de sistemas saudáveis e de sistemas afetados por patologia como a isquemia, manipulando-se as propriedades físicas e químicas do material para controle de difusão de oxigênio e nutrientes, por exemplo^[6]. Tais modelos podem também ser aplicados para se estudar interações célula-fármacos para a realização de *screening* farmacológico. Além disso, a capacidade de absorção do papel faz dele um suporte satisfatório para a criopreservação uma vez que este material demanda pouco volume de solução crioprotetora para a conservação biológica de células. Uma variedade de papéis comercialmente disponíveis é utilizada atualmente em culturas de células^[1]; a **Figura 3** ilustra as aplicações citadas.

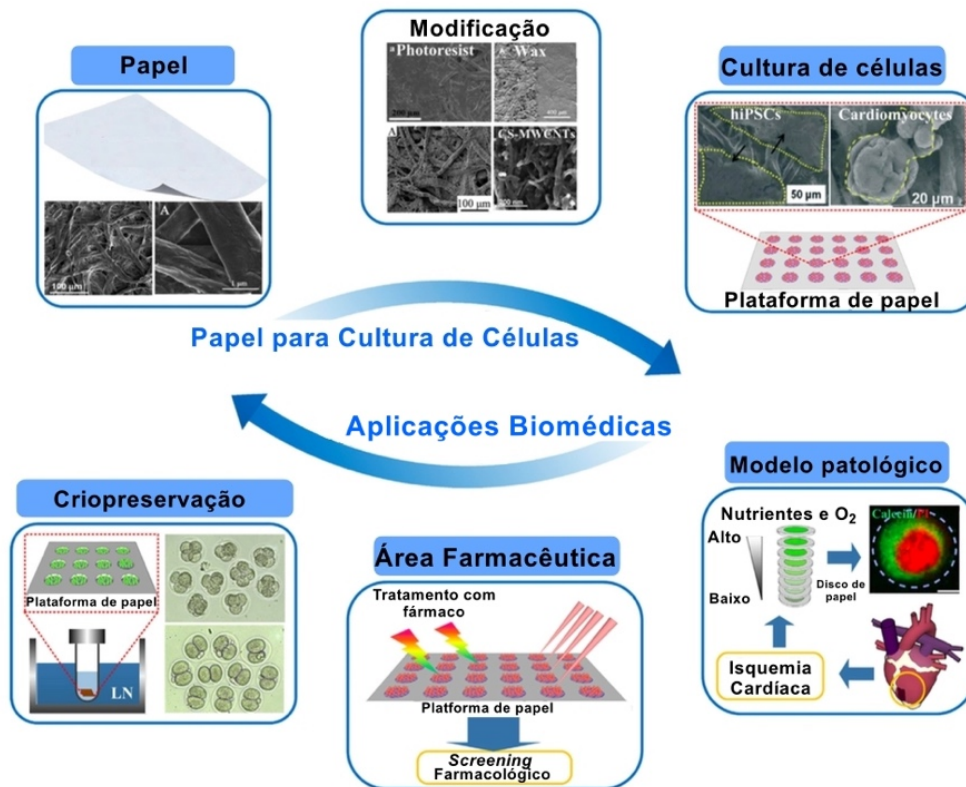


Figura 3. Aplicações biomédicas da plataforma de cultura celular baseada em papel. A modificação das propriedades físicas e químicas do papel permite que ele seja utilizado em cultura de células e controle de nutrientes e difusão de oxigênio, mimetizando o ambiente *in vivo* saudável e afetado por patologia (modelo patológico). Plataformas para cultura de células também podem ser aplicadas em estudo de interação célula-fármaco para triagem de drogas e na criopreservação de células.

Fonte: NG, et al. (2016), adaptado ^[1].

Plataformas semeadas por células podem ainda ser empregadas na engenharia de tecidos enquanto substitutos cutâneos, particularmente nos tratamentos de grandes perdas de pele e úlceras crônicas. Um exemplo deste tipo de produto é o Apligraf®[®], um substituto cutâneo formado por colágeno e povoado por fibroblastos e queratinócitos neonatais vivos ^[17]. Estas plataformas são projetadas para se integrar facilmente ao tecido lesado, e assim fornecer um ambiente ideal para o crescimento e diferenciação celular. Assim, as células cultivadas na plataforma, em princípio, devem ser transferidas para o tecido hospedeiro e assim estimular a formação de novo tecido ^[18].

1.3.2 Modificação da Superfície da CB para Aplicação em Cultivo Celular

A superfície nativa da CB é bioquimicamente inerte, o que implica em baixa adesão celular. Com o intuito de superar este impasse, diversas modificações de

superfície da CB têm sido investigadas a fim de se otimizar as interações entre diferentes linhagens de células e este biomaterial. Tais modificações, que podem ser feitas, por exemplo, via imobilização de biomoléculas e modificação química, são capazes de alterar as propriedades do material, como permeabilidade, molhabilidade e porosidade^[9].

Pesquisas vem sendo desenvolvidas acerca da imobilização de biomoléculas como fatores de crescimento e peptídeos sob superfície de CB bem como sob superfícies de compósitos de CB^[9]. Andrade e colaboradores (2010)^[19] modificaram a superfície da CB por meio da inserção da sequência tripeptídica RGD (Arg-Gly-Asp) encontrada em várias proteínas da matriz extracelular, e observaram que a adesão de fibroblastos embrionários de rato se mostrou maior e mais uniforme quando comparada à superfície nativa da CB.

A adesão de células à biomateriais pode também ser melhorada utilizando modificação química da superfície. Taokaew e colaboradores (2015)^[20] investigaram o efeito da modificação da superfície de CB com grupo amina (NH₂) e octadecil (C18) através da utilização dos organossilanos APTES ((3-aminopropil)triétoxissilano) e OTS (octadeciltriclorossilano) sobre a adesão de fibroblastos dérmicos humanos. As análises realizadas apontaram maior adesão e proliferação celular para as superfícies funcionalizadas com APTES (70-80% de cobertura da área pelas células) em relação à superfície de CB não modificada, enquanto resultado inverso (<5% de cobertura da área) foi observado para a superfície de CB funcionalizada com OTS.

Embora diversos grupos funcionais como metil (C1), carboxil (COOH) e tiol (SH) possam ser inseridos à superfície da CB através da reação de silanização, a literatura carece de estudos que empregam uma gama mais abrangente de silanos na modificação da superfície deste biopolímero e que correlacionam a influência dessas modificações na adesão de células sobre estes substratos. Este capítulo do trabalho, particularmente, explora a funcionalização da CB com grupo tiol via reação de silanização e sua influência na adesão de fibroblastos humanos, material ainda não explorado na literatura para esta finalidade.

1.3.2.1 Reação de Silanização

A modificação da superfície da celulose via reação de silanização se dá através de três etapas: hidrólise dos grupos alcóxi do silano, adsorção dos grupos silanol na superfície da celulose devido as ligações de hidrogênio formadas entre os

grupos hidroxila do silanol e da celulose e condensação, conforme esquema reacional apresentado na **Figura 4** a seguir [21].

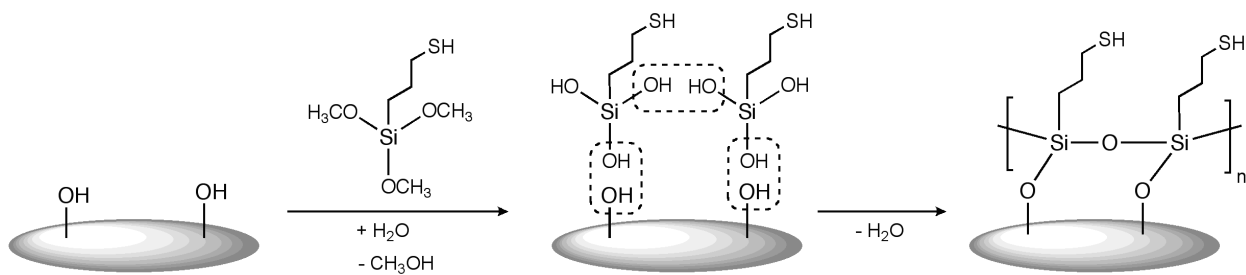


Figura 4. Esquema reacional da preparação da celulose bacteriana modificada.

As reações de hidrólise e condensação ocorrem via substituição nucleofílica bimolecular (SN2), de forma que estas reações são mais rápidas e efetivas quando são empregados catalisadores. Na reação de hidrólise sob condições ácidas, conforme se observa na **Figura 5**, um grupo alcóxido é inicialmente protonado, o que o torna um grupo de saída melhor. Paralelamente, a densidade de elétrons no átomo de silício passa a ser menor, tornando este átomo mais eletrofílico e, portanto, mais susceptível à ataque nucleofílico. O ataque nucleofílico pela água no átomo de silício leva à formação de um intermediário pentacoordenado em estado de transição. O decaimento do estado de transição leva à formação do álcool e do respectivo silanol com tetraedro de silício invertido [22].

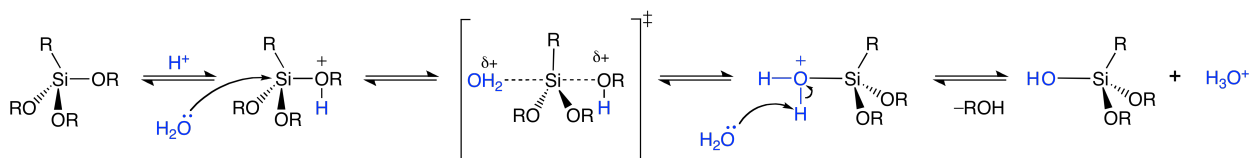


Figura 5. Mecanismo de hidrólise em meio ácido.

Na reação de hidrólise sob condições básicas, conforme se observa na **Figura 6**, a água se dissocia, levando à formação de ânions hidróxido. O ataque nucleofílico deste ânion no átomo de silício leva à formação de um intermediário pentacoordenado em estado de transição, carregado negativamente. O decaimento deste estado de transição leva à formação do ânion alcóxido bem como do silanol com tetraedro de silício invertido [22].

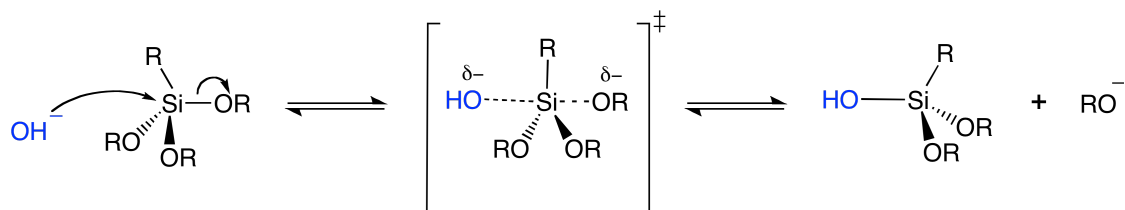


Figura 6. Mecanismo de hidrólise em meio básico.

O mecanismo mais amplamente aceito para a reação de condensação envolvendo silicatos e proposto por Iler ^[23], conforme exibido na **Figura 7**, envolve o ataque de um silanol desprotonado (nucleofílico) em uma espécie neutra de silicato. Particularmente no caso da etapa de condensação durante o processo de funcionalização da CB, este ataque nucleofílico se dá também em átomos de carbono da celulose ligados à OH livres.

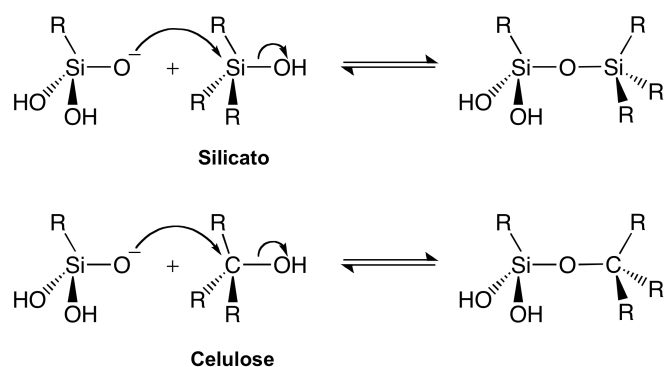


Figura 7. Mecanismo de condensação.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Haja visto as propriedades singulares da CB conforme destacado anteriormente, a presente seção do trabalho tem como objetivo geral a funcionalização química da superfície da CB para a obtenção de plataformas com propriedades melhoradas de adesão celular, para possível aplicação em cultivo celular.

2.2 Objetivos Específicos

I. Modificar a superfície da CB via reação de silanização com (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (MPTMS) por diferentes metodologias;

II. Avaliar a influência do método de modificação na adesão de células de linhagem normal sobre a superfície dos materiais produzidos, através de ensaios de viabilidade celular nos períodos de 24 e 48 horas.

3. Materiais e Métodos

3.1 Obtenção da Celulose Bacteriana

As membranas de CB foram gentilmente fornecidas pela empresa NEXFILL do grupo Seven Indústria de Produtos Biotecnológicos Ltda, situada no Paraná, Brasil. O cultivo da bactéria *Komagataeibacter xylinus* foi realizado em bandejas de 30 cm x 50 cm com tempo de cultivo de 96 horas a 28 °C. O meio de cultura apresenta a seguinte composição básica: glicose 2% (m/v), peptona 0,5% (m/v), extrato de levedura 0,5%, fosfato disódico anidro 0,27% (m/v) e ácido cítrico monohidratado 0,115% (m/v). As mantas de CB altamente hidratadas foram submetidas a um tratamento com solução básica de NaOH 1% (m/v) a temperatura de 70 °C para remoção das bactérias. As membranas secas comercializáveis têm aproximadamente 0,02 mm de espessura e foram manejadas todo tempo com as mãos calçadas de luvas a fim de evitar depósito de resíduo de gordura sobre o material.

3.2 Preparação das Membranas de CB Modificadas

Foram testadas quatro metodologias - A, B, C e D - para a funcionalização da superfície da CB com o grupo tiol por meio da utilização de MPTMS. Assim, as amostras foram nomeadas de acordo com o tratamento ao qual foram submetidas, da seguinte maneira: CBSH-A, CBSH-B, CBSH-C e CBSH-D.

Os Métodos A e B empregados envolvem condições reacionais brandas, conforme reportado, respectivamente, por Fernandes (2013)^[21] e Frone (2018)^[24] e seus colaboradores, os quais modificaram a superfície da CB com APTES. Em ambos os trabalhos, a superfície da CB foi modificada à temperatura ambiente; no primeiro caso acetona foi utilizado como solvente e a proporção silano:solvente foi de 1:10 (v/v), enquanto no segundo caso, utilizou-se como solvente uma mistura de etanol e água 9:1 (v/v), e a proporção empregada silano:solvente foi de 0,6:10 (m/m).

Os Métodos C e D, por sua vez, empregam quantidade significativamente menor de silano em relação aos métodos anteriores. Particularmente, o Método C compreende reação em solução aquosa catalisada por ácido e base em quantidades catalíticas, conforme condições reportadas por Beaumont e colaboradores (2018)^[25]. O Método D, por sua vez, consiste de reação em etanol e água 10:1 catalisada por base fraca, conforme reportado por Lu e colaboradores (2012)^[26].

Em todos os casos foram preparadas membranas de CB de área padrão de 1,5 cm². Uma vez tratadas, as membranas foram armazenadas em atmosfera inerte sob vácuo.

3.2.1 Método A – Silanização em Acetona

Em um tubo tipo falcon, adicionou-se 0,25g de CB. Acetona foi empregada como solvente, de forma que três concentrações foram testadas: 0,538 mmolL⁻¹ (1 mL de silano e 10 mL de solvente), 0,135 mmolL⁻¹ (0,25 mL de silano e 10 mL de solvente) e 0,034 mmolL⁻¹ (0,0625 mL de silano e 10 mL de solvente). Neste caso, as amostras tratadas foram também identificadas quanto as referidas concentrações de silano utilizadas: C1 - 0,538 mmolL⁻¹, C4 - 0,135 mmolL⁻¹ (concentração 4x menor que C1) e C16 - 0,034 mmolL⁻¹ (concentração 16x menor que C1). Particularmente a mais alta concentração empregada, C1, foi aquela respaldada na literatura [21].

O sistema foi incubado sob agitação com o auxílio de um homogeneizador de tubos (rotação de 360° em torno do eixo horizontal) à temperatura ambiente (T.A., em torno de 25 °C) por 4 horas. Em seguida, o excesso da solução foi decantado e descartado de maneira apropriada. As membranas foram lavadas com o solvente de composição idêntica ao utilizado na reação para remoção de resíduos do meio reacional. Para secagem, as membranas de CB modificadas foram espalhadas sobre a superfície de uma placa de Petri e secas à T.A.

3.2.2 Método B – Silanização em Etanol e Água 9:1

Em um tubo tipo falcon, adicionou-se 0,25g de CB. Empregou-se como solvente uma mistura de etanol e água 9:1 (v/v), de forma que foi testada uma única concentração: 0,538 mmolL⁻¹ (1 mL de silano e 10 mL de solvente), ou seja, C1.

Assim como no Método A, o sistema foi incubado sob agitação à T.A./25 °C por 4 horas. Dado o tempo reacional, o excesso da solução foi decantado e descartado e as membranas foram lavadas com o solvente de composição idêntica ao empregado na reação para a remoção dos resíduos. Testou-se dois métodos de secagem: à T.A. e à 120 °C por 1 hora.

3.2.3 Método C – Silanização Catalisada em Solução Aquosa

Em um tubo tipo falcon, adicionou-se 0,25g de CB. As membranas foram colocadas em contato o solvente - água - por um período de 5 minutos. Em seguida, adicionou-se quantidade catalítica de ácido clorídrico 0,5M, seguida da adição do

silano – a concentração final da solução foi de 0,043 mmolL⁻¹ (concentração 12x menor que C1).

Manteve-se o sistema sob agitação à T.A./25 °C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se hidróxido de sódio 0,5M e manteve-se o sistema em agitação por mais 3 horas. Dado o tempo reacional, o excesso da solução foi decantado e descartado e as membranas foram lavadas com água e acetona para a remoção dos resíduos reacionais. As membranas foram secas por dois métodos: à T.A. e à 120 °C por 5 horas.

3.2.4 Método D – Silanização Catalisada em Etanol e Água 10:1

Em um tubo tipo falcon, adicionou-se 0,25g de CB. As membranas foram colocadas em contato com o solvente - uma mistura de etanol e água 10:1 (v/v) – por 5 minutos. Feito isto, adicionou-se hidróxido de amônio e, em seguida, o silano. Neste caso, a concentração final da solução foi de 0,164 mmolL⁻¹ (concentração 3x menor que C1).

O sistema foi incubado sob agitação à T.A./25 °C por 15 horas. Finalmente, o excesso da solução foi decantado e descartado e as membranas foram lavadas com água e acetona para a remoção dos resíduos. Assim como no método C, as membranas foram secas à T.A. e à 120 °C por 5 horas.

3.3 Ensaios Biológicos

A fim de se avaliar a capacidade de adesão de células à superfície dos materiais produzidos, realizaram-se ensaios de viabilidade celular por fluorescência baseados no uso do sal de resazurina como indicador, conforme reportado por Pagé e colaboradores (1993) ^[27]. Para a realização dos ensaios, foi utilizada a linhagem celular de fibroblasto de pulmão humano normal GM07492. Foram realizadas um total de três replicatas do experimento.

As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino e solução antibiótica, e foram mantidas em câmara úmida a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂. Após cultivadas, as células foram tripsinizadas e o sistema centrifugado para que as células mortas fossem retiradas. As células viáveis foram então resuspendidas em meio DMEM. A contagem de células foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

Para o ensaio de viabilidade celular, foram utilizados 3 poços para cada grupo experimental, em triplicata, da seguinte maneira: Poço 1: Membrana, Poço 2: Células, Poço 3: Membrana + Células. Nos poços necessários, foi adicionado

suspensão celular ($1,5 \times 10^4$ células/poço), enquanto nos poços contendo apenas as membranas, foi adicionado 100 μL de PBS - as placas foram incubadas a 37 °C por um período de 24 horas. Após esse período, adicionou-se 50 μL de solução de resazurina $0,004 \text{ mol L}^{-1}$ em meio DMEM em cada poço. Conforme recomendado pelo manual da *Thermo Fischer*, após 4 horas de incubação a 37 °C e mediante a alteração da cor da solução decorrente da redução da resazurina, fez-se a leitura da absorbância das soluções através de leitor de microplacas em filtro de 570 nm.

A fim de realizar o ensaio de viabilidade celular em 48 horas na mesma placa, os poços foram lavados com PBS. Em seguida, adicionou-se 100 μL de meio DMEM suplementado e o sistema foi novamente incubado por mais 24 horas, totalizando 48 horas do início do experimento. Após esse período, da mesma maneira, adicionou-se 100 μL de solução de resazurina aos poços e após 4 horas de incubação a 37 °C, fez-se a leitura da absorbância das soluções.

3.4 Técnicas Empregadas na Caracterização dos Materiais

a) Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

As plataformas de CB foram caracterizadas estruturalmente através da técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho por reflectância total atenuada (FTIR-ATR, do inglês *Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance*). Os espectros no infravermelho foram obtidos no espectrômetro NICOLET IS5 da *Thermo Scientific*, no módulo de Transmissão iD3 ATR com cristal de germânio sob as seguintes condições: background de 32 *scans*, análise da amostra com 32 *scans*, resolução de 2 cm^{-1} e faixa de absorção de $4000\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$.

b) Análise Termogravimétrica

As propriedades térmicas das plataformas foram determinadas via análise termogravimétrica (TGA, do inglês *Thermogravimetric Analysis*), termogravimetria derivada (DTG, do inglês *Derivative Thermogravimetric*) e calorimetria exploratória diferencial (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*). As curvas TG/DTG e DSC foram obtidas no equipamento *TA Instruments* usando uma célula SDT Q600. As condições utilizadas nos experimentos foram: atmosfera de ar sintético com fluxo contínuo de 100 mL/min e razão de aquecimento de 10 °C por minuto. A temperatura inicial foi de 30 °C e a temperatura final de 600 °C. Foi pesado aproximadamente 5 mg de amostra, utilizando-se cadinho de alumina como referência.

c) Análise Elementar

Os teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre (CHNS) das amostras foram determinados via combustão seca em analisador elementar, modelo 2400 Séries II, da *Perkin Elmer*.

d) Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X (XPS)

As membranas foram analisadas por XPS utilizando-se um espectrômetro K-Alpha (Thermo Fisher Scientific, Reino Unido) operando com radiação $K\alpha$ emitida por um tubo de raio X com ânodo de alumínio acoplado a um monocromador. A fim de se extrair informações referentes à composição elementar das superfícies das amostras, os espectros no modo *survey* foram adquiridos com energia de passagem de 200eV em dois pontos aleatórios de cada amostra. Trinta scans foram adquiridos e a média foi calculada por amostra, de forma que duas amostras por tratamento foram analisadas. Os dados XPS foram tratados por meio do software Thermo Advantage, versão 5.921 (Thermo Fisher Scientific).

e) Microscopia Eletrônica de Varredura

A caracterização morfológica das plataformas se deu por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de Alta Resolução com Emissão por Campo. O equipamento utilizado para a obtenção das imagens foi o microscópio eletrônico de varredura de emissão por campo *Jeol JSM 7500F*. As amostras foram acomodadas em *stub* de latão com o auxílio de fita dupla face de carbono, onde foram recobertas por evaporação de 1 fio de carbono (cobertura de aproximadamente 5 nm de espessura) no metalizador *Bal-Tec SCD 050 Sputter Coater*.

f) Ângulo de Contato

As medidas de ângulo de contato foram realizadas com um goniômetro Ramé-Hart, modelo 260, conectado a uma câmera. Mediram-se os ângulos de contato de gotas de 2-3 μL de água deionizada e diiodometano sobre a superfície dos materiais. As medidas foram tomadas em três pontos aleatórios de cada amostra, de modo que para cada gota foram obtidos três valores com intervalo de 0,01 segundo entre cada medida.

g) Espectroscopia de Fluorescência

No ensaio de fluorescência foram utilizados filtros de excitação em 530 nm e emissão em 590 nm. As leituras foram realizadas com o auxílio do leitor de microplacas *Cytation*, da *Biotek*®.

4. Resultados

4.1 Caracterização das Plataformas Baseadas em CB produzidas via Método A (Silanização em Acetona) e Método B (Silanização em Etanol e Água 9:1)

A espectroscopia vibracional é uma ferramenta poderosa na identificação, na determinação de grupos funcionais e nos estudos de conformação e estrutura de macromoléculas. A maior parte dos estudos referentes a absorção no infravermelho referem-se à região média, de 400 a 4000 cm^{-1} , onde se localizam as frequências vibracionais fundamentais ^[28].

A espectroscopia na região do UV/Vis, por sua vez, está associada às transições eletrônicas, nas quais elétrons são promovidos de um estado de mais baixa energia para outro mais energético. Na análise de espectroscopia na região do UV/Vis, que emprega luz na região ultravioleta (185 - 400 nm) e na região visível (400 - 700 nm), as intensidades das radiações transmitidas e absorvidas são detectadas pelo equipamento e a quantidade de radiação absorvida é calculada ^[29].

A **Figura 8** a seguir apresenta o espectro no infravermelho das membranas nativas de CB bem como das amostras submetidas à reação com maior concentração de silano, C1, via Métodos A e B.

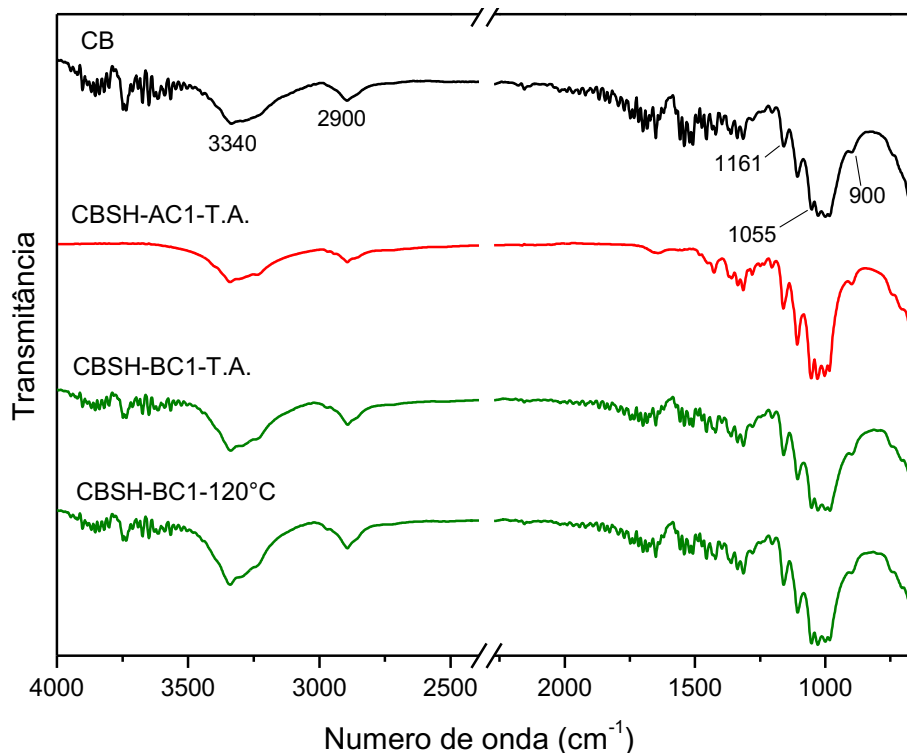


Figura 8. Espectro vibracional na região do infravermelho das membranas de CB nativa e modificadas via Métodos A e B.

As curvas apresentadas no espectro de FTIR-ATR apresentam o mesmo perfil entre si. Observa-se uma banda fraca em 900 cm^{-1} , atribuída a modos vibracionais das ligações glicosídicas C-O-C $\beta(1\rightarrow4)$ existentes entre as unidades de glicose, uma banda em 1.055 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-O de álcool primário e uma banda em 1.161 cm^{-1} , atribuída à deformação axial assimétrica C-O-C do anel piranose da glicose. As bandas em 2.900 cm^{-1} e em 3.340 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos de C-H e CH₂ e ao estiramento O-H de água adsorvida à superfície da celulose, respectivamente [30]. Para as membranas modificadas, não foi possível observar a banda correspondente à deformação do grupo Si-O-Celulose na região entre $1.100\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, uma vez que esta banda foi coberta pelas bandas intensas características das deformações C-O-C da celulose [24].

A termogravimetria (TG) é uma técnica de análise térmica que monitora o comportamento de uma amostra enquanto esta é submetida a uma programação controlada de temperatura. Através da detecção de alterações da massa da amostra

em função da temperatura e/ou do tempo, é possível que sejam determinadas a temperatura na qual a amostra começa a se decompor e as faixas de temperatura nas quais a amostra mantém sua composição química constante. Esta técnica possibilita, ainda, acompanhar o andamento de reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição, etc. As curvas referentes a termogravimetria derivada (DTG) ao evidenciarem as inflexões da TG, permitem a pronta determinação das temperaturas nas quais a taxa de variação de massa é máxima, T_{pico} , bem como das temperaturas onde são observados o início e o fim da deflexão das curvas térmicas, T_{onset} e T_{endset} , respectivamente [31]. A **Figura 9** exibe as curvas referente à análise TGA e DTG para a amostra nativa de CB, sob atmosfera de ar sintético.

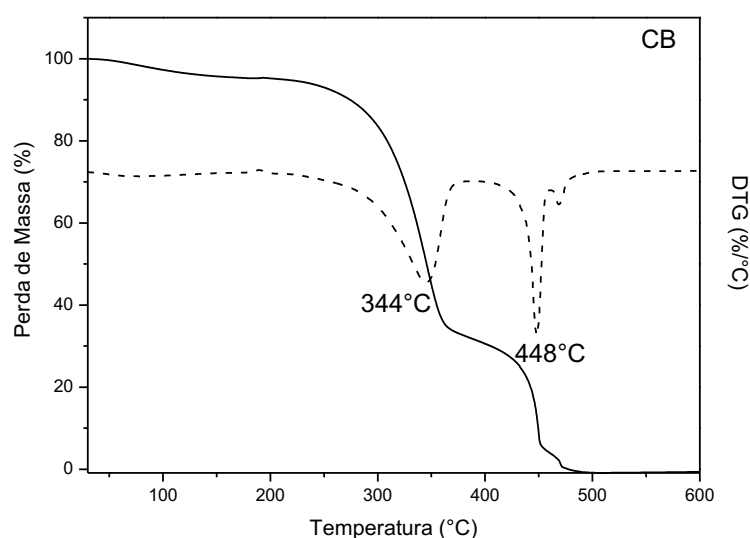


Figura 9. Curvas de TG e DTG da CB sob atmosfera de ar sintético.

Analisando-se as curvas, observa-se perda de massa de cerca de 5% na faixa entre 30-150 °C, atribuída à evaporação de moléculas de água adsorvidas na superfície do material. Observa-se, posteriormente, dois eventos de perda de massa mais significativos: o primeiro de aproximadamente 60% na faixa de 200-380 °C e o segundo de aproximadamente 35% na faixa de 380-480 °C. Tais eventos se relacionam à decomposição da celulose, que conforme pode ser observado na curva DTG, ocorre em duas etapas com temperaturas máximas de degradação em 344 °C e 448 °C. As etapas de degradação da celulose dizem respeito ao processo de despolimerização, de decomposição das unidades glicosídicas e de formação de

resíduos gasosos ^[13]. A ausência de resíduo à 600 °C apresentada pela amostra é indicativo da pureza da CB.

A **Figura 10** exibe as curvas referentes à análise TGA e DTG sob atmosfera de ar sintético para as amostras de CB tratadas via Método A nas três concentrações empregadas (C1, C4 e C16).

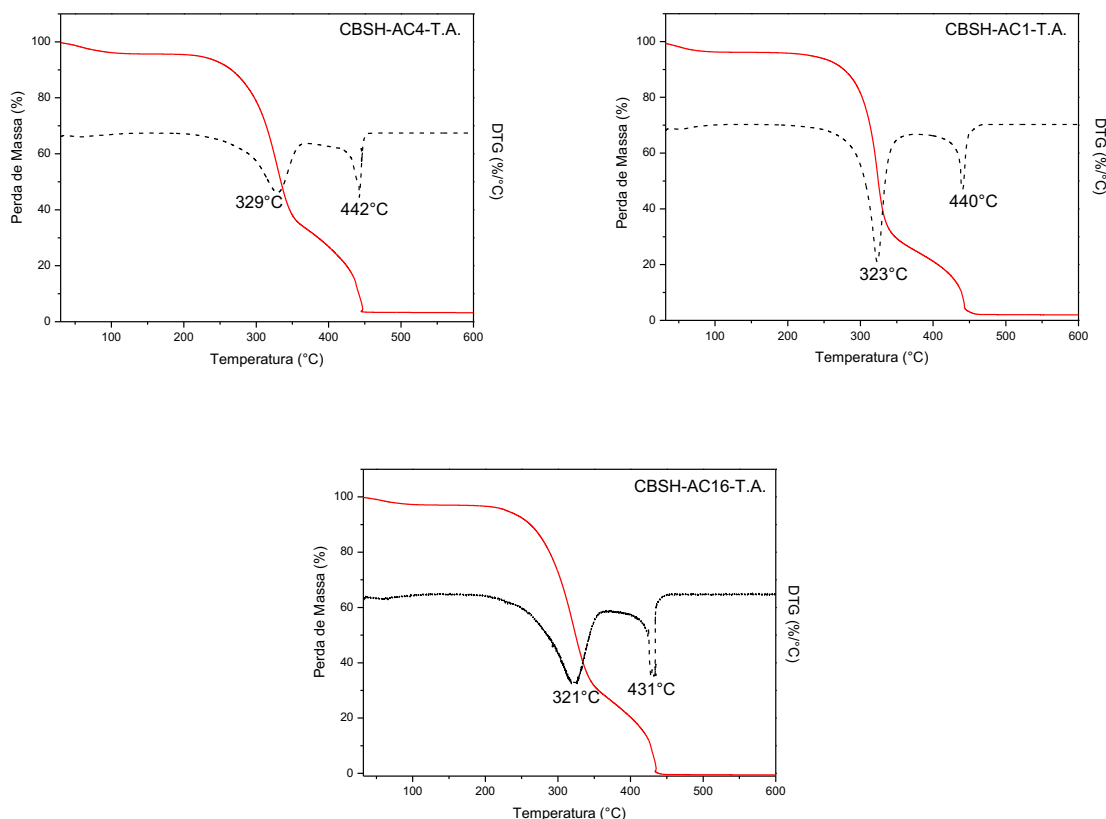


Figura 10. Curvas de TG e DTG das membranas de CB modificadas via Método A, sob atmosfera de ar sintético.

A **Figura 11**, por sua vez, exibe as curvas referentes à análise TGA e DTG sob atmosfera de ar sintético para as amostras de CB modificadas via Método B e secas nas duas diferentes temperaturas.

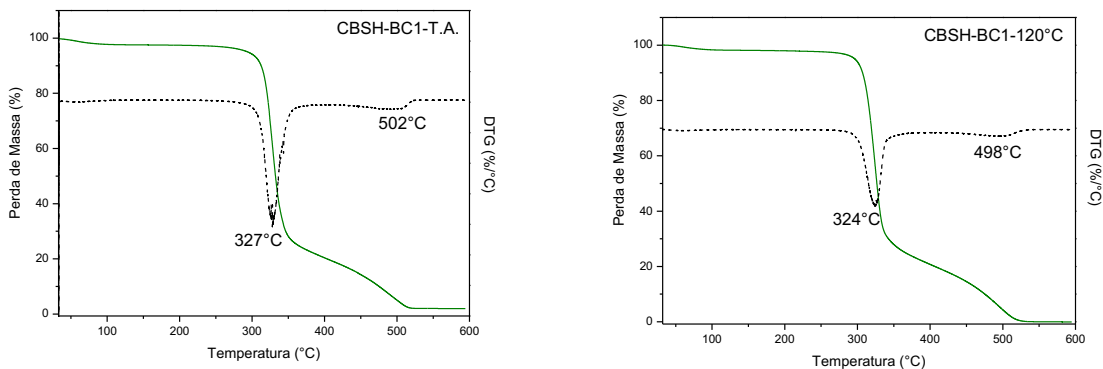


Figura 11. Curvas de TG e DTG das membranas CB-C1 modificadas via Método B secas à T.A. e à 120 °C, sob atmosfera de ar sintético.

Conforme se observa nas Figuras 10 e 11, as curvas TG e DTG apresentadas pelas membranas tratadas exibem o mesmo perfil, embora aquelas relacionadas ao Método B exibam perda de massa com inflexões mais acentuadas que as relacionadas ao Método A. Ainda a porcentagem de resíduo remanescente foi baixa, o que sugere baixo teor de MPTMS na superfície das amostras tratadas.

Com base nas curvas apresentadas sob atmosfera de ar sintético, as porcentagens de perda de massa dos eventos térmicos e a T_{onset} do primeiro evento de degradação determinada pelo método das tangentes, são mostradas na **Tabela 1** a seguir.

Tabela 1. Porcentagem de perda de massa dos eventos térmicos e temperatura de *onset* do primeiro evento de degradação das amostras de CB Nativa e modificadas via Métodos A e B.

		Amostra	Perda de Água (%)	Perda de Massa do 1º Evento (%)	Perda de Massa do 2º Evento (%)	T_{onset} (°C)
		CB	5	60	35	279
Método	A	CBSH-AC1-T.A.	5	70	28	303
		CBSH-AC4-T.A.	5	60	32	292
		CBSH-AC16-T.A.	3	68	29	281
	B	CBSH-BC1-T.A.	2	74	24	315
		CBSH-BC1-120 °C	2	74	24	309

De acordo com os dados exibidos na Tabela 1, as membranas submetidas à reação de silanização via Método A exibiram de 3-5% de perda de água adsorvida à superfície do material, enquanto as tratadas via Método B exibiram perda menor, de

2%. Além disso, de maneira geral, a perda de massa relacionada ao primeiro evento de degradação das membranas submetidas à modificação, foi maior em relação à membrana não modificada. Ainda, considerando que a T_{onset} do primeiro evento de degradação foi maior para as amostras tratadas em relação à referência, tem-se que os procedimentos aplicados aumentaram a estabilidade térmica do material.

A análise elementar dos elementos CHNS é utilizada na determinação das proporções entre os átomos de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre presentes em um material. Esta técnica permite a caracterização qualitativa dos componentes da substância por meio da comparação entre as proporções experimentais e teóricas dos átomos, bem como a determinação da pureza da amostra. A metodologia consiste na combustão completa da amostra na presença de excesso de oxigênio, o que leva a produção de gases CO_2 , H_2O , NO_x e SO_x , que são posteriormente separados e analisados [32].

A **Tabela 2** a seguir exhibe os dados de análise elementar da amostra nativa de CB (referência) e das amostras submetidas à modificação com MRPMS frente à maior concentração testada, C1, via Métodos A e B à T.A.

Tabela 2. Teor de C, H, N e S das amostras de CB Nativa e modificadas via Métodos A e B à T.A.

		Amostra	Carbono (%)	Hidrogênio (%)	Nitrogênio (%)	Enxofre (%)
		CB	42,45	5,75	0,87	1,04
Método	A	CBSH-AC1-T.A.	42,51	6,14	0,92	1,24
	B	CBSH-BC1-T.A.	42,23	5,97	0,94	1,37

A inserção de MPTMS na superfície do material implicaria necessariamente no aumento da porcentagem de enxofre (S), elemento presente na extremidade do referido silano. Conforme se observa na tabela anterior, a porcentagem de enxofre nas amostras submetidas aos tratamentos mostra-se muito próxima à apresentada pela membrana de CB nativa. Embora este valor seja um pouco maior para as amostras tratadas, considerando que a exatidão e a precisão do equipamento são $\leq 0,3\%$ e $\leq 0,2\%$, respectivamente, estes resultados não permitem concluir que as superfícies das amostras tratadas foram funcionalizadas.

A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X é a mais versátil técnica de análise superfícies. Na análise de XPS são empregados elétrons de baixa energia capazes de penetrar apenas algumas camadas atômicas da amostra (0,5 a

3,0 nm). A energia associada a estes fótons é suficiente para ejetar fotoelétrons do material. Como os níveis de energia são quantizados, os fotoelétrons possuem uma distribuição de energia cinética que consiste de picos discretos, o que permite a identificação dos átomos presentes na superfície do material. A intensidade dos sinais, dado por meio da área integrada sob o pico fotoelétrico, é proporcional a quantidade dos átomos no volume analisado, de modo que esta análise de superfície pode ser considerada semi-quantitativa ^[33]. Em geral, os limites de detecção do XPS variam de 0,1 a 1% em porcentagem atômica ^[34].

A **Figura 12** a seguir exhibe os espectros de XPS no modo *survey* para a amostra nativa de CB e para as amostras submetidas à modificação com MRPMS via Métodos A e B.

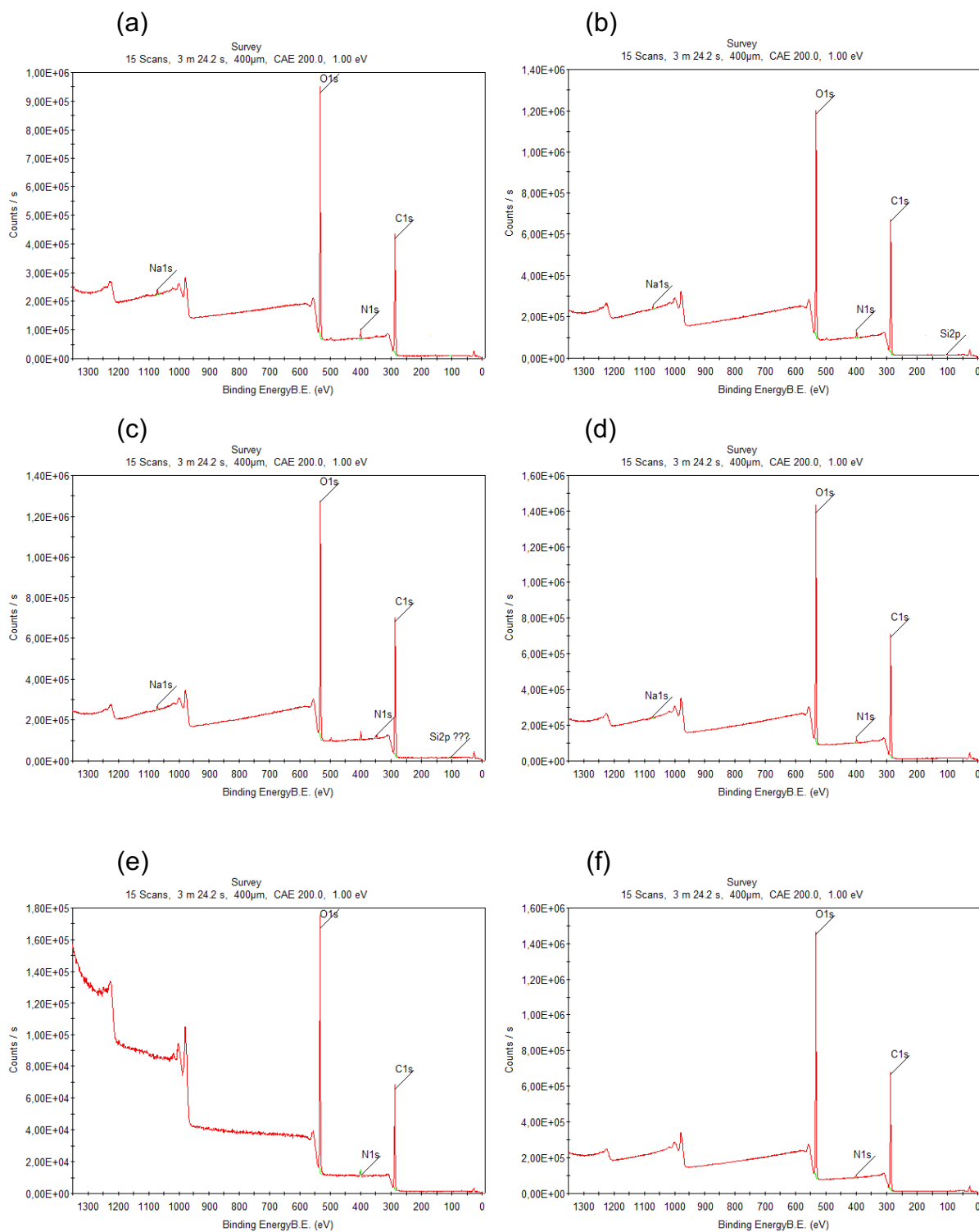


Figura 12. Espectro de XPS no modo *survey* da amostra (a) CB (b) CBSH-AC1-T.A. (c) CBSH-AC4-T.A (d) CBSH-AC16-T.A (e) CBSH-BC1-T.A. (f) CBSH-BC1-120 °C.

Os espectros de XPS exibem dois picos principais em 533,1eV e 286,8eV, correspondentes, respectivamente, ao O 1s e ao C 1s da matriz de CB [34]. Ainda, foi possível detectar o pico correspondente ao N 1s em 400,24eV, elemento este

proveniente do extrato de levedura utilizado como fonte de nitrogênio durante o processo de produção da CB.

As amostras tratadas exibiram o mesmo perfil da curva da CB nativa, sem que tenha sido possível observar claramente a presença de novos sinais. Apesar disso, foi possível detectar para as amostras modificadas via Método A com maior concentração e com concentração intermediária de silano (sob as condições C1 e C4, respectivamente), um sinal em 102,1eV correspondente ao Si 2p ^[35]. Nestas condições, a porcentagem atômica elementar média de Si nas amostras foi determinada em 0,46% e em 0,37%, respectivamente, frente à 37,32% de O 1s.

A análise de XPS apresentada por Frone e colaboradores ^[36] nas mesmas condições, aponta porcentagem atômica elementar média de Si de 4,8% para a superfície de CB modificada, resultado este 10x superior ao obtido. De posse desta informação somado ao fato de que a porcentagem atômica elementar média de Si nas amostras tratadas encontra-se na faixa do limite de detecção do aparelho - 0,1-1% em porcentagem atômica ^[34] – não é possível atestar que as superfícies das amostras tratadas foram funcionalizadas via Métodos A e B.

As técnicas de microscopia eletrônica são as principais ferramentas disponíveis no estudo da estrutura fina e da morfologia de materiais. O microscópio eletrônico de varredura é geralmente utilizado para o estudo de estruturas superficiais ou subsuperficiais de amostras, de forma que as imagens geradas têm alta profundidade de foco ^[37]. O microscópio eletrônico de transmissão, por sua vez, é utilizado quando se é necessário obter informações em nível de superfície ou atômico, bem como detalhes microestruturais da amostra. Embora a MET apresente um melhor poder de resolução em relação à MEV, as áreas observadas são restritas e a preparação de amostras, trabalhosa ^[38].

As **Figuras 13-18** a seguir apresentam imagens obtidas por MEV da superfície da membrana de CB, bem como das membranas modificadas via Métodos A e B.

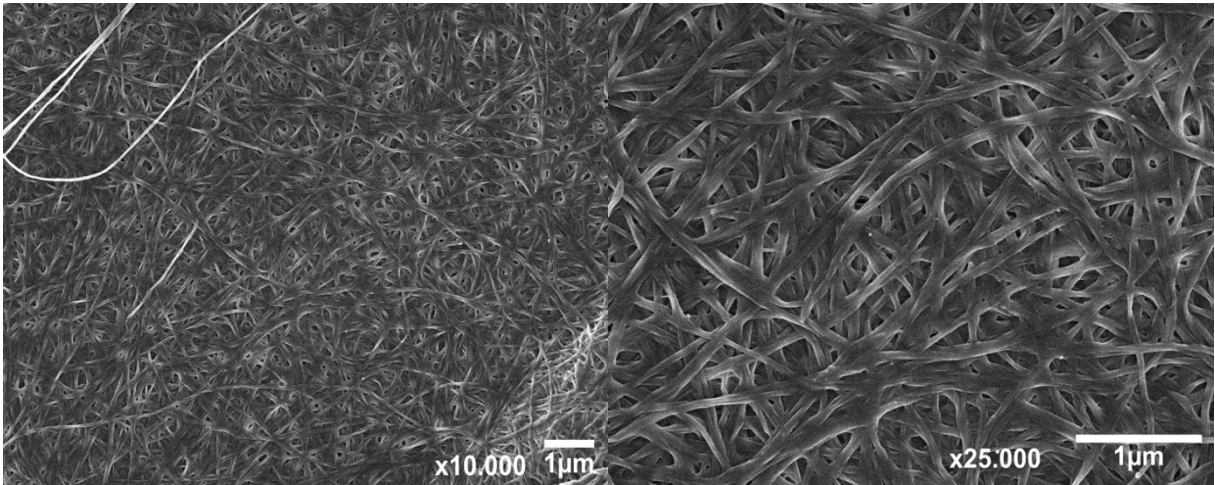


Figura 13. Análises morfológicas por MEV da superfície da amostra de CB.

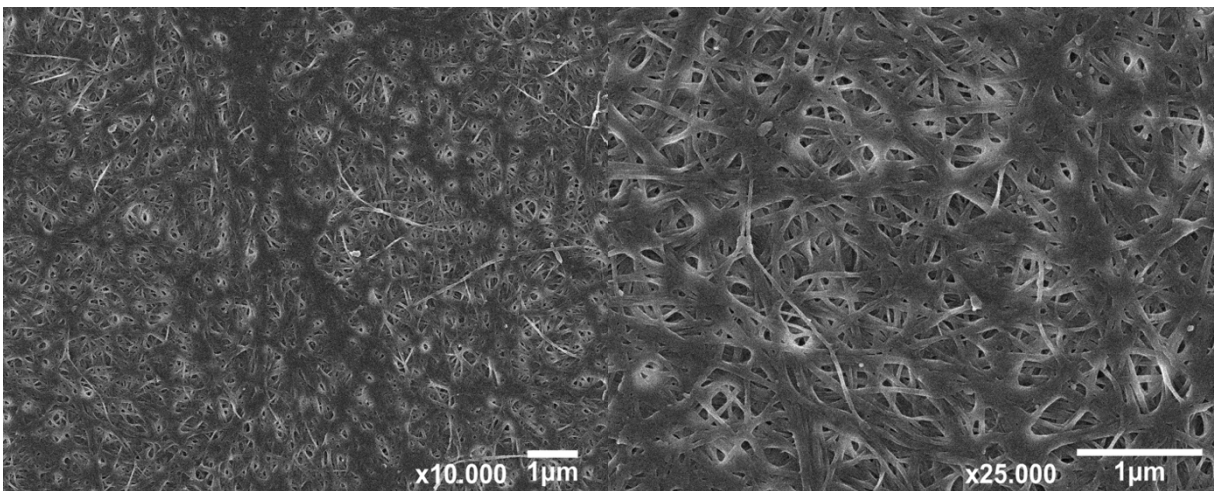


Figura 14. Análises morfológicas por MEV da superfície da amostra CBSH-AC1-T.A.

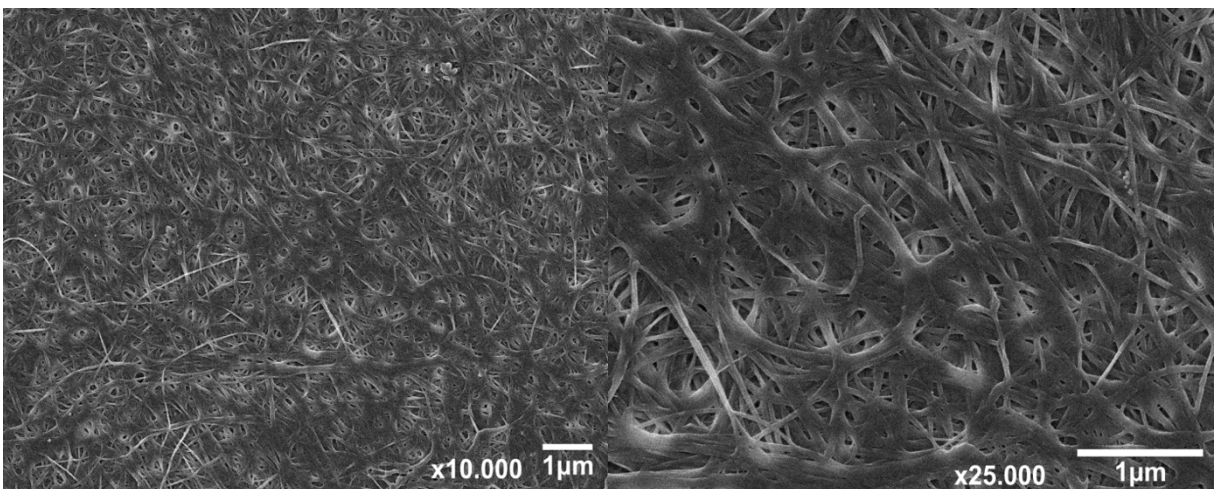


Figura 15. Análises morfológicas por MEV da superfície da amostra CBSH-AC4-T.A.

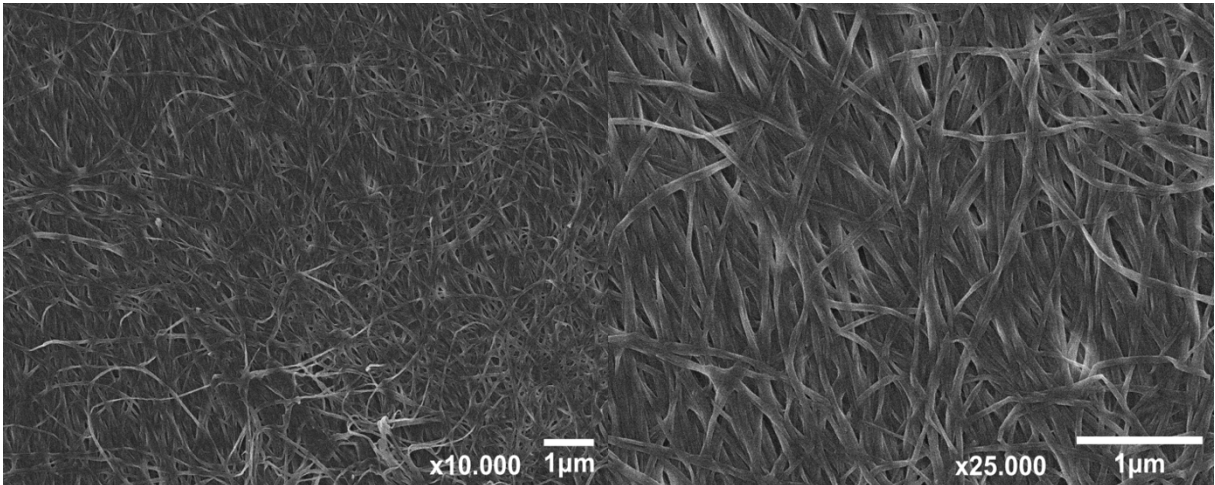


Figura 16. Análises morfológicas por MEV da superfície da amostra CBSH-AC16-T.A.

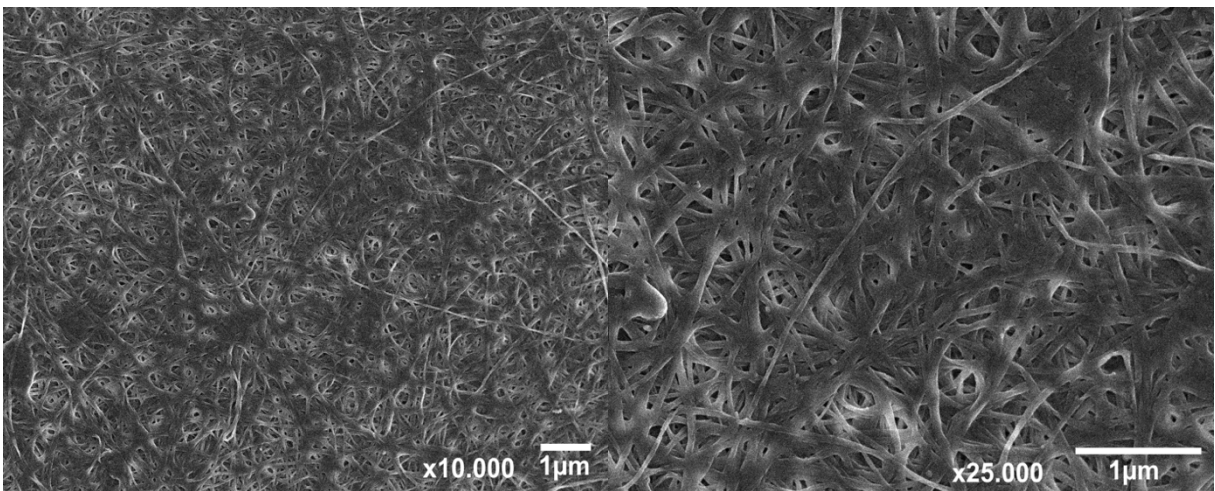


Figura 17. Análises morfológicas por MEV da superfície da amostra CBSH-BC1-T.A.

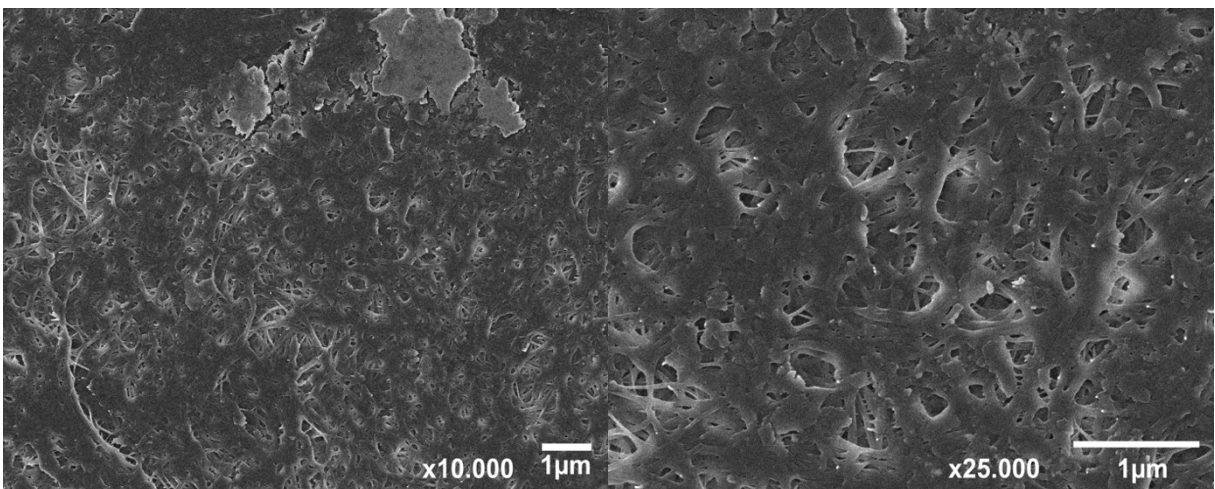


Figura 18. Análises morfológicas por MEV da superfície da amostra CBSH-BC1-120 °C.

Observa-se que a matriz de CB apresenta estrutura tridimensional distinta, constituída por uma rede ultrafina de nanofibras de celulose, com área superficial e porosidade elevada, de forma que pode ser considerada um *nanopaper*.

Ainda, observa-se que as membranas submetidas ao tratamento com o silano via ambos Métodos A e B e secas à T.A., mostraram-se muito semelhantes em relação à nativa. Em particular, a membrana modificada via Método B e seca à 120 °C exibiu a superfície mais fechada após o tratamento.

Haja visto que as condições empregadas não foram efetivas na funcionalização da superfície da CB, adotou-se dois novos protocolos de silanização com esta mesma finalidade. O Método C se baseia no protocolo de silanização em meio aquoso de fibras e nanofibras de celulose reportado por Beaumont e colaboradores (2018) ^[25], o qual emprega quantidades catalíticas de ácido clorídrico e hidróxido de sódio, em duas etapas. A ácido tem por função hidrolisar o silano à silanol, o qual é solúvel em água, enquanto a adição subsequente da base favorece a etapa de condensação entre os grupos hidroxila da superfície da CB e dos silanóis. O Método D, por sua vez, se fundamenta na metodologia empregada por Lu e colaboradores (2012) ^[26] no revestimento de nanopartículas magnéticas com sílica via tetraetilortossilicato como precursor da camada de sílica. Este método emprega a base fraca hidróxido de amônio 0,5M que favorece a etapa de condensação da reação.

4.2 Caracterização das Plataformas Baseadas em CB produzidas via Método C (Silanização Catalisada em Solução Aquosa) e Método D (Silanização Catalisada em Etanol e Água 10:1)

A **Figura 19** apresenta o espectro no infravermelho da membrana nativa de CB, bem como das amostras submetidas à reação via Métodos C e D.

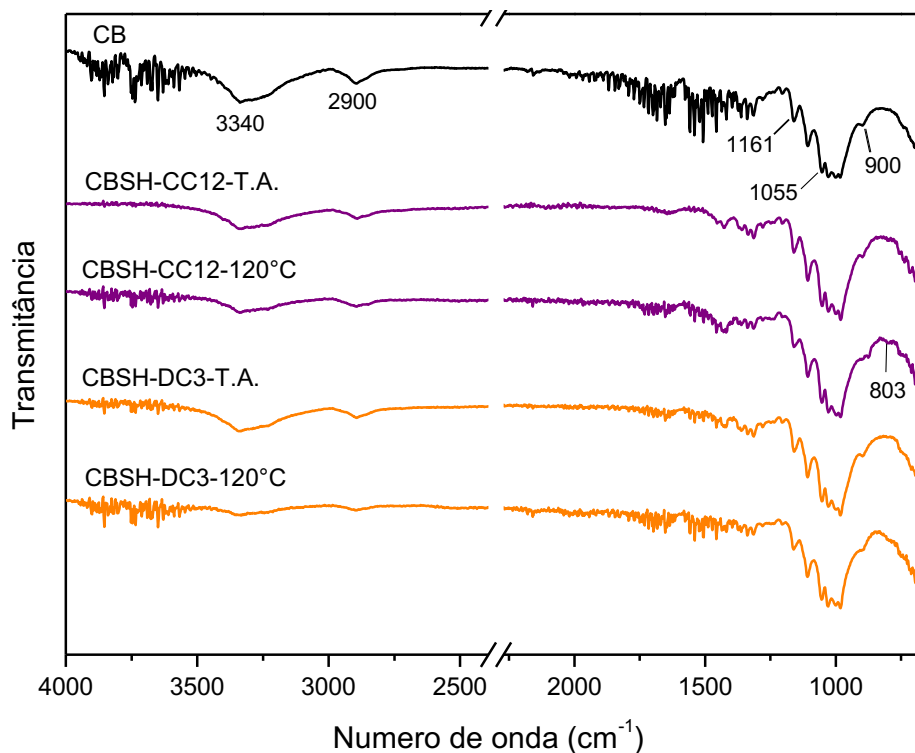


Figura 19. Espectro vibracional na região do infravermelho das membranas de CB nativa e modificadas via Métodos C e D.

As curvas apresentadas nos espectros de FTIR-ATR apresentam o mesmo perfil entre si. Observa-se, entretanto, que as bandas entre 3.000-3600 cm^{-1} atribuídas ao estiramento O-H são menos intensas para as amostras tratadas em relação à CB nativa. Isto acontece porque, com a modificação, a quantidade de grupos hidroxila livres presentes na superfície da celulose torna-se menor, haja visto que reagem com os grupos silanol ^[39]. Ainda conforme reportado pela literatura ^[25], para a amostra CBSH-CC12-120 °C é possível observar uma banda de pouca intensidade em 803 cm^{-1} correspondente ao estiramento Si-O.

As **Figuras 20-21** a seguir exibe as curvas referentes à análise TGA e DTG sob atmosfera de ar sintético para as amostras modificadas via Métodos C e D.

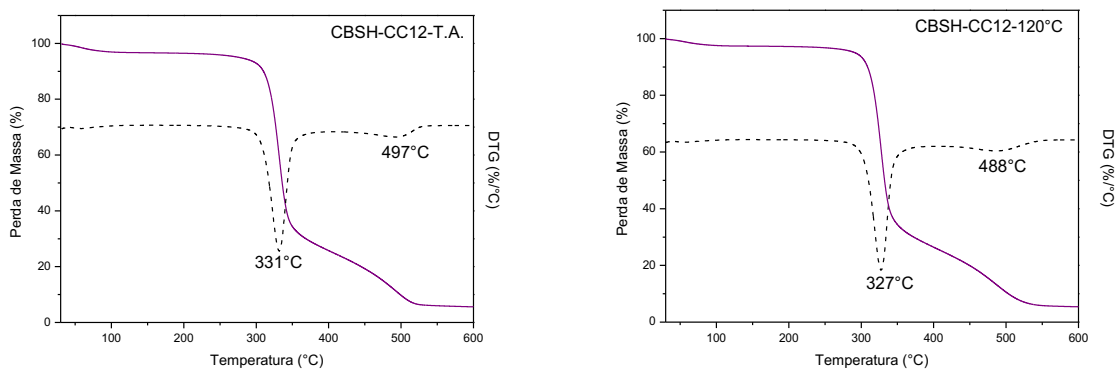


Figura 20. Curvas de TG e DTG das membranas modificadas via Método C e secas à T.A. e à 120 °C, sob atmosfera de ar sintético.

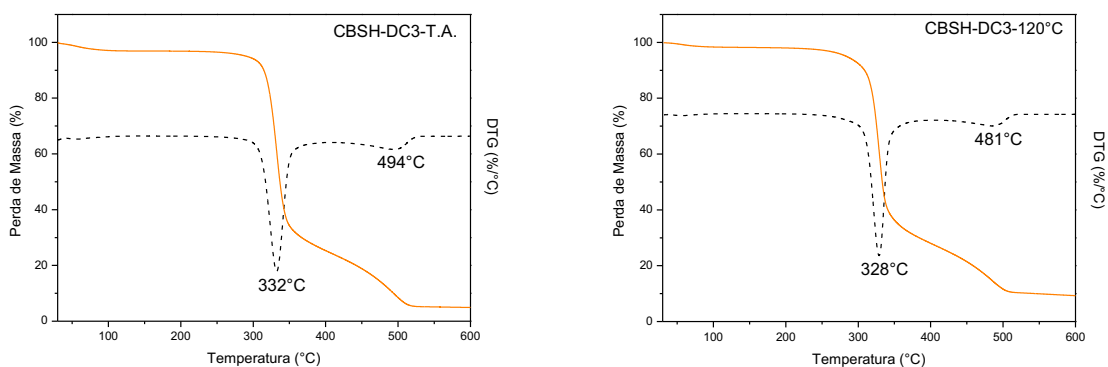


Figura 21. Curvas de TG e DTG das membranas modificadas via Método D e secas à T.A. e à 120 °C, sob atmosfera de ar sintético.

Observa-se que as curvas TG e DTG apresentadas pelas membranas tratadas exibem o mesmo perfil entre si. As amostras submetidas aos tratamentos apresentaram resíduo de 5,6 - 9,3% a 600 °C, frente à 0% para a CB pura. A presença deste resíduo nas amostras tratadas foi atribuída ao MPTMS enxertado à superfície da CB.

A **Tabela 3** apresenta os dados extraídos das referidas curvas, além dos dados relativos à referência (CB nativa), tendo sido a T_{onset} igualmente determinada pelo método das tangentes.

Tabela 3. Porcentagem de perda de massa dos eventos térmicos e T_{onset} do primeiro evento de degradação das amostras de CB Nativa e modificadas via Métodos C e D.

		Amostra/Solvente	Perda de Água (%)	Perda de Massa do 1º Evento (%)	Perda de Massa do 2º Evento (%)	T_{onset} (°C)
		CB	5	60	35	240
Método	C	CBSH-CC12-T.A.	3	69	17	210
		CBSH-CC12-120 °C	2	68	17	275
	D	CBSH-DC3-T.A.	2	69	17	281
		CBSH-DC3-120 °C	1	68	15	259

De acordo com os dados exibidos na Tabela 3, as membranas submetidas à reação de silanização via Métodos C e D exibiram de 1-3% de perda de água adsorvida à superfície do material. Assim como ocorreu com as amostras tratadas via Métodos A e B, de maneira geral a perda de massa relacionada ao primeiro evento de degradação das membranas submetidas à modificação foi maior em relação à membrana nativa. Ainda, haja visto que a T_{onset} do primeiro evento de degradação foi maior para a maior parte das amostras tratadas em relação à nativa, de maneira geral o procedimento aplicado aumentou a estabilidade térmica das amostras.

A **Tabela 4** a seguir exhibe os dados de análise elementar da amostra nativa de CB e das amostras submetidas à modificação com MRPMS via Métodos C e D.

Tabela 4. Teor de C, H, N e S das amostras de CB Nativa e modificadas via Métodos C e D.

		Amostra	Carbono (%)	Hidrogênio (%)	Nitrogênio (%)	Enxofre (%)
		CB	42,45	5,75	0,87	1,04
Método	C	CBSH-CC12-T.A.	40,46	6,46	0,96	5,47
		CBSH-CC12-120 °C	41,79	6,50	1,16	3,38
	D	CBSH-DC3-T.A.	40,16	6,26	0,91	3,73
		CBSH-DC3-120 °C	41,24	6,39	1,03	3,93

Observa-se que a porcentagem de S nas amostras submetidas aos tratamentos foi de 3-5 vezes maior em relação a apresentada pela CB nativa, de forma que a amostra CBSH-CC12-T.A. foi a que apresentou maior quantidade desse elemento, 5,47%. Assim tem-se que as metodologias aplicadas neste caso se mostraram eficazes na modificação da superfície da CB e que a secagem à 120 °C -

processo de cura - teve pouca ou nenhuma influência no rendimento da modificação de superfície.

A análise de Ângulo de Contato (AC) é comumente utilizada para caracterizar a molhabilidade de uma superfície e, assim, permite inferir se ela foi ou não funcionalizada [20,40]. O AC se refere ao ângulo formado entre a reta que tangencia a gota do líquido empregado na análise e a superfície do material, conforme ilustrado na **Figura 22**, e está diretamente correlacionado com a energia superficial de uma superfície sólida [40].

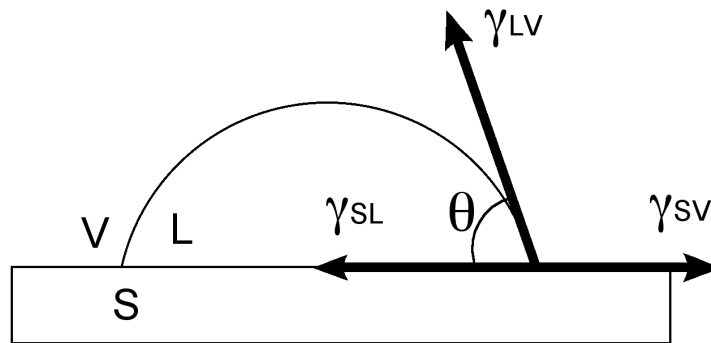


Figura 22. Representação dos vetores das tensões interfaciais, onde γ_{SL} =, sólido-líquido, γ_{SV} = sólido-vapor e γ_{LV} = líquido-vapor.

Fowkes definiu a energia de superfície como a soma das contribuições das interações dispersivas e polares [41], conforme exposto na **Equação 1** a seguir:

$$\gamma = \gamma^D + \gamma^P \quad (\text{Equação 1})$$



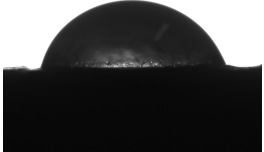

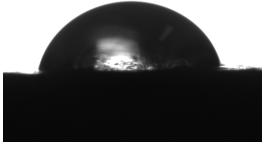

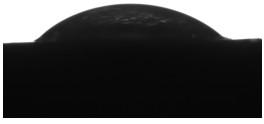



Como uma extensão do modelo de Fowkes, Wu propôs um modelo harmônico que descreve de forma mais confiável as interações entre um polímero e um líquido comum [42], conforme **Equação 2** a seguir:

$$\gamma_{LV}(1 + \cos \theta) = 4 \left[\frac{\gamma_{SV}^D * \gamma_{LV}^D}{\gamma_{SV}^D + \gamma_{LV}^D} + \frac{\gamma_{SV}^P * \gamma_{LV}^P}{\gamma_{SV}^P + \gamma_{LV}^P} \right] \quad (\text{Equação 2})$$

Assim, calculou-se as componentes dispersivas e polares, γ_{SV}^D e γ_{SV}^P , através do modelo harmônico de Wu. Para isso, as medidas de AC foram tomadas utilizando um solvente apolar e um polar, diiodometano e água, com tensões superficiais γ_{LV}^D e γ_{LV}^P conhecidas. Finalmente, as energias de superfície foram calculadas a partir do

modelo de Fowkes. As médias harmônicas dos AC, a imagem das gotas em contato com as superfícies e as energias de superfície estão apresentados na **Tabela 5**. O gráfico da **Figura 23**, o quais exhibe as medidas relacionadas ao AC, permite uma análise ainda mais clara do comportamento dos solventes testados sobre a superfície das membranas.

Tabela 5. Valores das medidas de AC entre gotas de água e diiodometano e amostras CB Nativa e modificadas via Métodos C e D.

Método	Amostra	Ângulo de Contato (°)		Energia de Superfície
		Água	Diiodometano	
C	CB	 38,8 ± 1,5	 25,3 ± 1,1	73,0
	CBSH-CC12-T.A.	 72,0 ± 1,1	 26,8 ± 3,9	56,6
	CBSH-CC12-120 °C	 75,8 ± 3,3	 26,4 ± 3,5	55,1
D	CBSH-DC3-T.A.	 41,3 ± 2,6	 26,8 ± 3,9	71,4
	CBSH-DC3-120 °C	 29,8 ± 6,9	 22,7 ± 1,5	77,5

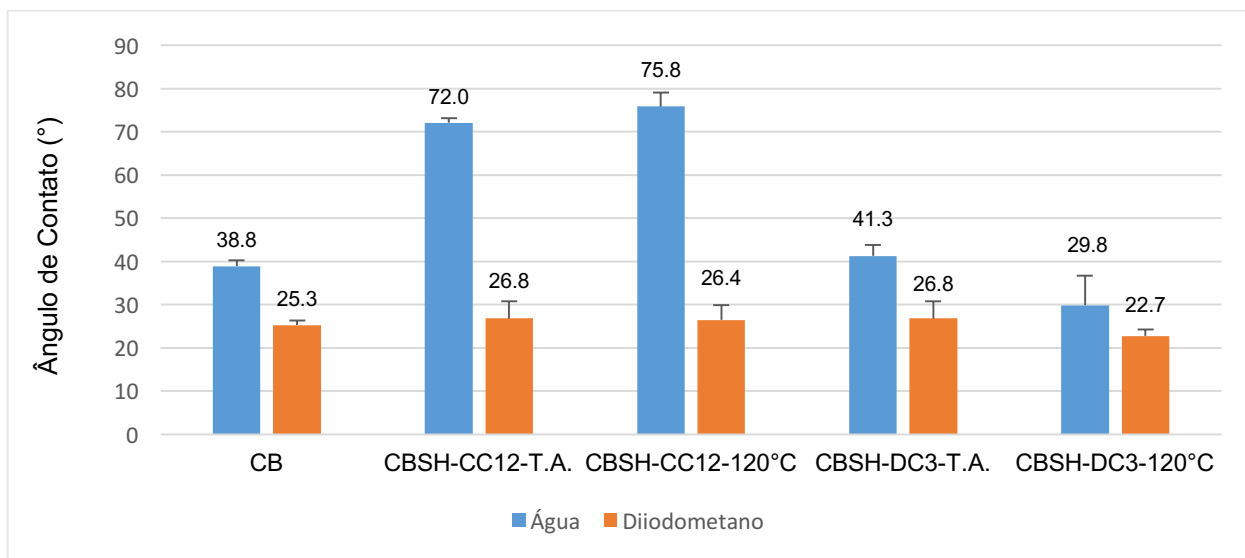


Figura 23. Gráfico dos valores de AC entre gotas de água e diiodometano e membranas CB Nativa e modificadas via Métodos C e D.

Tomando a água como solvente referência, por definição tem-se que superfícies hidrofílicas apresentam AC menor que 90° enquanto as hidrofóbicas apresentam AC entre 90-150°. Ainda, superfícies com AC entre 150-180° são consideradas superhidrofóbicas enquanto aquelas que apresentam AC menor que 5° são consideradas superhidrofílicas ^[43]. De acordo com os dados apresentados, observa-se no ensaio realizado com a água que as amostras submetidas à modificação via Método C, CBSH-CC12-T.A. e CBSH-CC12-120 °C, mostraram-se menos hidrofílicas do que as amostras tratadas via Método D, CBSH-DC3-T.A. e CBSH-DC3-120 °C.

O AC entre a gota do solvente e a superfície do polímero depende de vários fatores, como rugosidade, grupo funcional presente na superfície do material e energia de superfície ^[44]. Haja visto que as superfícies das quatro amostras tratadas foram funcionalizadas com a inserção do grupo tiol, no que tange o AC o comportamento divergente entre as amostras tratadas via Método C em relação as tratadas via Método D pode ser explicado tanto pela energia de superfície discrepante entre os dois grupos quanto pelo rearranjo diferenciado das fibras da CB, conforme se observa nas imagens de MEV das **Figuras 24 e 25** a seguir.

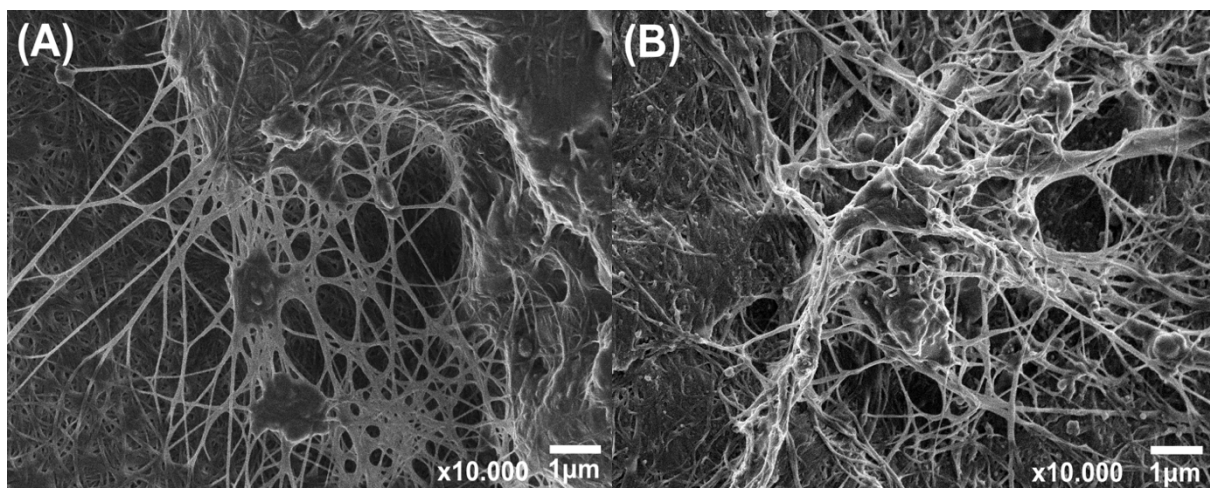


Figura 24. Análises morfológicas por MEV da superfície das amostras (A) CBSH-CC12-T.A. e (B) CBSH-CC12-120 °C.

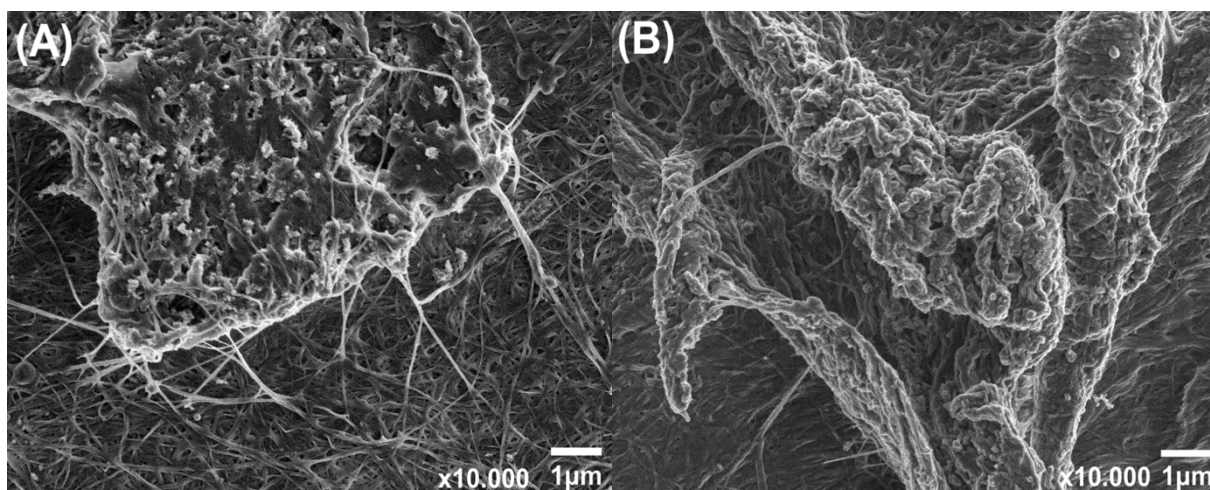


Figura 25. Análises morfológicas por MEV da superfície das amostras (A) CBSH-DC3-T.A. e (B) CBSH-DC3-120 °C.

As superfícies das amostras tratadas via ambos os métodos se mostraram significativamente diferentes em relação à superfície da CB nativa, entretanto elas mantiveram a estrutura nanométrica das fibras, característica deste biopolímero. Particularmente para amostras tratadas via Método C, CBSH-CC12-T.A. e CBSH-CC12-120 °C, o espaçamento entre as nanofibrilas mais externas parece ter aumentado. Em contrapartida, no caso das amostras funcionalizadas via Método D, CBSH-DC3-T.A. e CBSH-DC3-120 °C, as nanofibrilas se apresentaram mais empacotadas, particularmente no caso da amostra submetida ao processo de cura.

4.3 Ensaios Biológicos das Plataformas Baseadas em CB produzidas via Métodos C e D

No ensaio de cultivo celular realizado em placa de poliestireno tratado, os poços contendo apenas células foram tomados como controle de viabilidade celular haja visto que este substrato tem sido utilizado para a cultura de células animais e humanas há mais de 50 anos por favorecer adesão e proliferação celular [45]. A **Figura 26** a seguir exibe fotos que ilustram células aderidas no fundo da placa de cultivo e na superfície das amostras submetidas aos ensaios celulares após 48 horas de cultivo. Conforme se observa, embora os fibroblastos tenham aderido as membranas, eles não se espalharam completamente por suas superfícies. As imagens foram obtidas com o auxílio de um microscópio invertido com aumento de 40x.

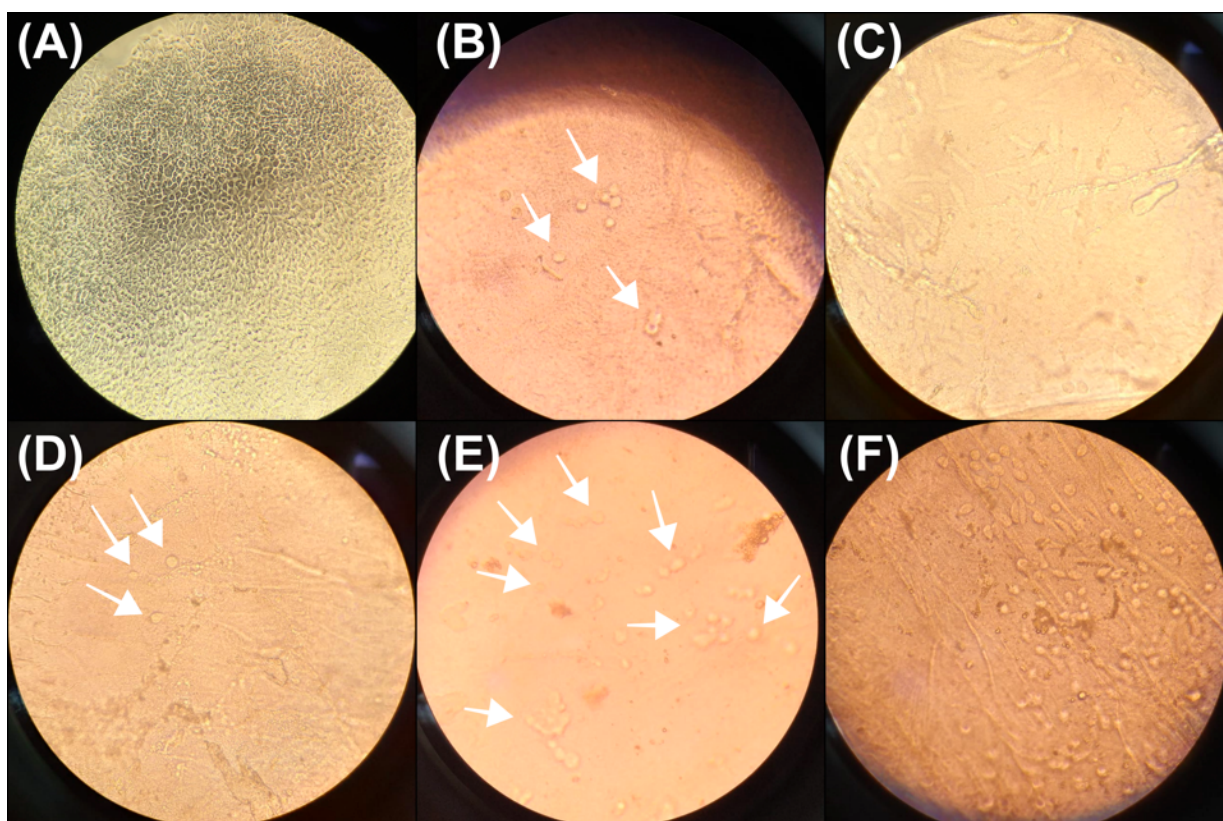


Figura 26. Fotos das células aderidas (A) ao fundo placa de cultura celular; (B) à membrana de CB; (C) à amostra CBSH-CC12-T.A. (D) à amostra CBSH-CC12-120 °C; (E) à amostra CBSH-DC3-T.A. e (F) à amostra CBSH-DC3-120 °C.

A análise estatística para porcentagem de viabilidade celular em 24 e 48 horas foi realizada de acordo com o Teste t de Student pareado, com nível de confiança de 95% ($\alpha=0,05$) – os dados extraídos da referida análise são exibidos na

Figura 27. Neste caso, a viabilidade celular em 24 horas do controle foi tomada como 100%.

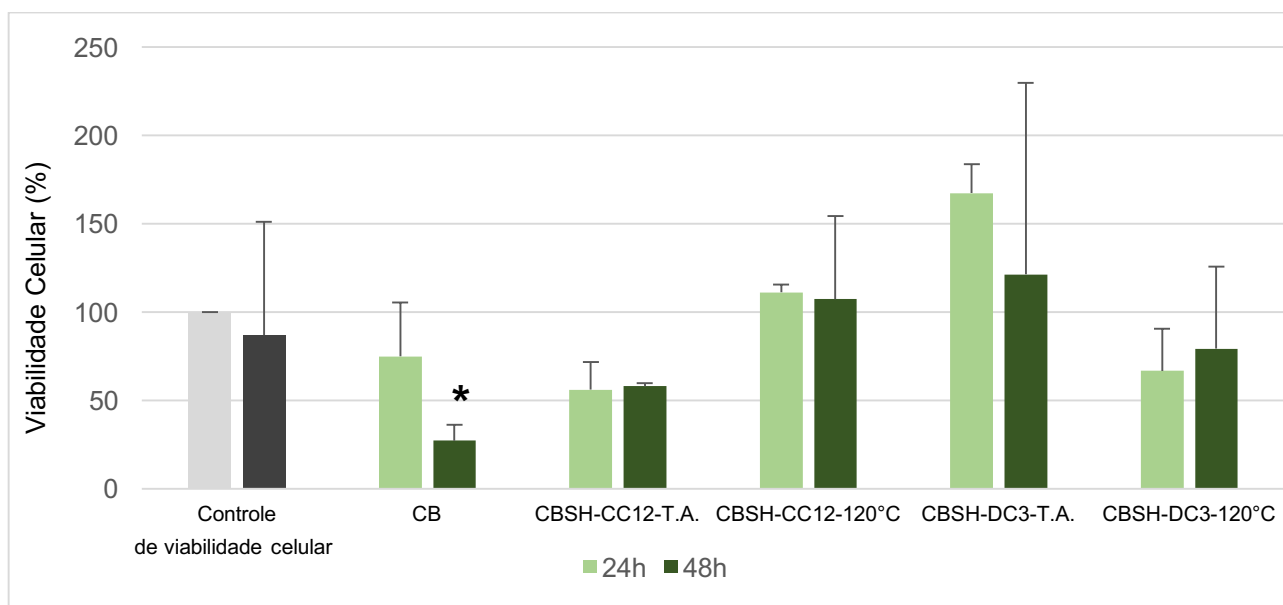


Figura 27. Gráfico de viabilidade celular em 24 e 48 horas, onde o asterisco indica diferença estatística significativa para o mesmo grupo.

No caso do controle, o teste aplicado indica que não houve diferença estatisticamente significativa quando comparada a porcentagem de viabilidade celular em 24 e 48 horas, revelando que as células se mantiveram aderidas e, portanto, vivas e com o metabolismo ativo durante todo o experimento.

Decorridas as 24 horas do início do experimento, a viabilidade celular da CB mostrou-se mais baixa do que a viabilidade do controle. Estudos prévios demonstram que a CB não tem efeito citotóxico sobre uma variedade de células [46-48], assim este resultado sugere que o número de células aderidas à superfície deste material mostrou-se menor que o número de células aderidas ao fundo da placa de cultivo. Ainda, a viabilidade celular média da CB em 48 horas apresentou-se menor que em 24 horas, de forma que houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos. Isto pode ter ocorrido porque, no decorrer do período de cultura, grupos de fibroblastos se proliferaram e formaram aglomerados que se desprenderam da membrana – estes mesmos comportamentos foram descritos previamente por Sanchavanakit e colaboradores (2006) [48] ao realizarem ensaio semelhante com fibroblastos humanos de pele normal. Estes resultados indicam que, em relação à

placa tradicional de cultura celular, a CB é um suporte menos favorável para a adesão de fibroblastos.

Para os materiais tratados, a viabilidade celular média em 24 horas das amostras CBSH-CC12-T.A. e CBSH-DC3-120 °C em relação ao controle foi ainda menor, o que revela que, assim como a CB, também estes materiais não se mostram como um suporte tão adequado para a adesão de fibroblastos quanto o poliestireno tratado. Em contrapartida, a viabilidade celular média em 24 horas das amostras CBSH-CC12-120 °C e CBSH-DC3-T.A. mostrou-se maior em relação ao controle, de forma que em ambos os casos não houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 24 e 48 horas. Estes resultados sugerem que estes materiais se mostram como suportes promissores para a adesão de células, notadamente para fibroblastos saudáveis.

5. Conclusões do Capítulo

A modificação da superfície da CB via silanização com MPTMS nas condições testadas mostrou-se efetiva apenas quando empregadas as reações catalisadas por HCl e NaOH bem como por NH₄OH, conforme apontado pelo conjunto de análises realizadas.

Entre as membranas de CB funcionalizadas com grupo tiol, as amostras CBSH-CC12-T.A. e CBSH-DC3-120 °C não se mostram como um bom suporte para a adesão de fibroblastos enquanto as amostras CBSH-CC12-120 °C e CBSH-DC3-T.A. se revelaram como suportes promissores para a adesão celular. Este fato sugere que a adesão de células à superfície da CB, neste caso, depende não apenas do grupo funcional disponível na matriz, mas também de outras variáveis como o arranjo das fibras.

6. Perspectivas

- Tratar a CB por deposição direta de MPTMS sobre sua superfície e submeter as plataformas produzidas aos ensaios celulares a fim de que seja avaliado se a adesão celular neste caso, de fato, depende da funcionalização da superfície do material com grupo tiol ou apenas do arranjo diferenciado das fibras provocado pelos tratamentos empregados neste trabalho;

- Submeter as plataformas preparadas aos testes de adesão celular com linhagem celular distinta daquela utilizada neste trabalho, para que seja possível obter conclusões mais abrangentes com relação ao comportamento celular sobre a superfície dos materiais produzidos.

Capítulo 2: Plataforma Sensora

1. Introdução

1.1 Sensores Colorimétricos Baseados em AuNPs

Recentemente as AuNPs emergiram como uma importante ferramenta de diagnóstico baseados em testes colorimétricos para a detecção de várias substâncias incluindo biomoléculas como DNA ^[49], proteínas ^[50] e antígenos ^[51]. As grandes vantagens da utilização das AuNPs se dá no método simples de preparo e funcionalização ^[52] e dos baixos limites de detecção causada por suas propriedades ópticas, mais especificamente pelo efeito da ressonância de plasmon de superfície localizado ^[53].

1.1.1 Efeito da Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado

O efeito da Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado (LSPR, do inglês *Localized Surface Plasmon Resonance*), ocorre em NPs metálicas com dimensões muito menores que o comprimento de onda da luz incidente. Esse efeito consiste na oscilação coletiva dos elétrons livres (plasmons) na superfície das NPs, criando uma densidade de carga na região. No caso das AuNPs, esse efeito implica em uma acentuada absorção de luz na região do visível ^[53], de forma que a suspensão apresenta coloração vermelha característica.

A ligação de moléculas na superfície das NPs provoca mudanças na frequência da LSPR, e, portanto, no comprimento de onda, fenômeno este que permite detectar moléculas no meio. Esta mudança é explorada no desenvolvimento de sensores ^[53], particularmente de biossensores colorimétricos, uma vez que a mudança no comprimento de onda pode acarretar mudança significativa na cor da solução. A **Figura 28** a seguir ilustra o efeito LSPR causado por um feixe de luz no caso de uma AuNP esférica.

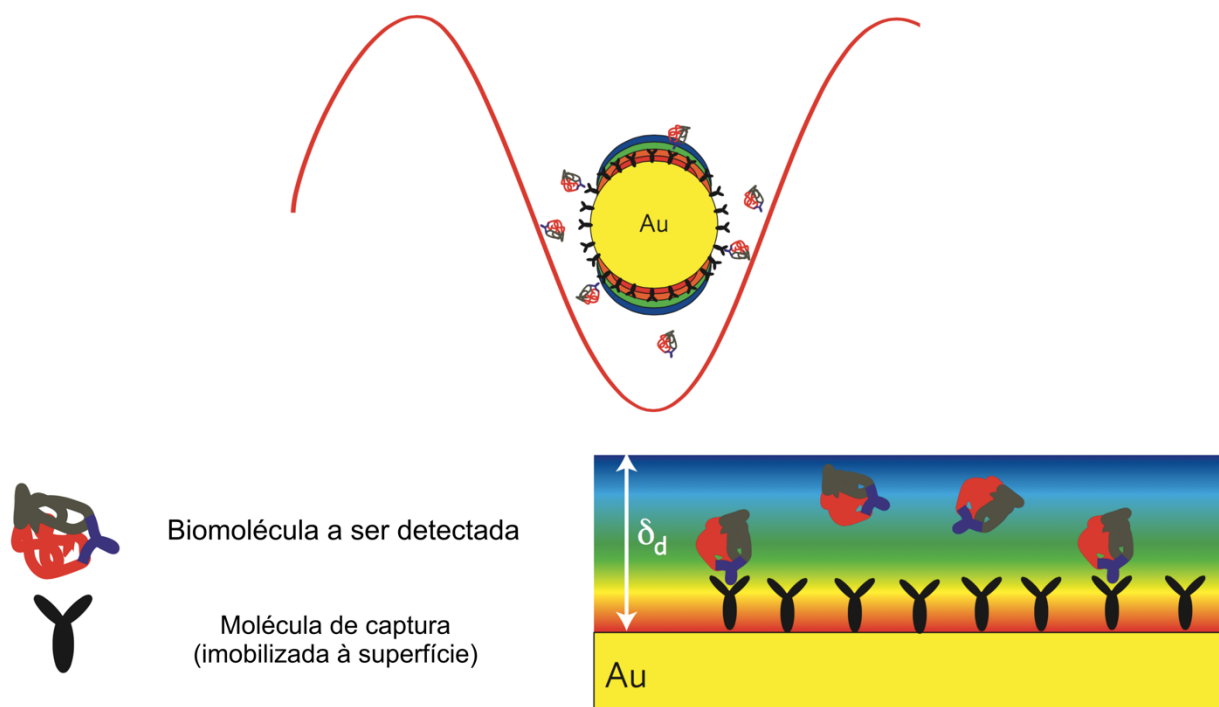


Figura 28. Representação esquemática do efeito LSPR para uma AuNP. Quando o diâmetro da partícula é muito menor que o comprimento de onda da luz incidente (por exemplo, uma partícula de 10 nm de diâmetro, luz visível), um dipolo elétrico é gerado em sua superfície.

Fonte: BROLO, A. G. (2012), adaptado ^[53].

1.1.2 Funcionalização das AuNPs

A funcionalização apropriada das AuNPs é um ponto crítico no desenvolvimento desses biossensores ^[52]. A cisteína (Cys) por possuir o grupo tiol em sua cadeia lateral, tem uma afinidade particularmente alta pelas AuNPs, haja visto a alta afinidade do grupo tiol com o ouro. Assim, a Cys tem sido usada na funcionalização de AuNPs como um *linker*, uma vez que os grupos amina e carboxila permanecem livres para a conjugação com a biomolécula de interesse. Este princípio é empregado em vários biossensores, que permitem a ligação de proteínas à superfície das NPs ^[54].

Raj e colaboradores (2015) ^[55] desenvolveram um sensor para a detecção de *E. coli*. 0157:H7 baseado em AuNPs funcionalizadas com cisteína, as quais apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de 24 ± 2 nm e potencial zeta de $-30,8 \pm 2$ mV. A banda plasmônica determinada em 524 nm, deslocou-se 5 nm para o comprimento de onda mais elevado em relação às AuNPs sintetizadas. No caso da bactéria testada, o limite de detecção do biossensor foi de 100 células/mL.

1.1.3 Biossensores Baseados em AuNPs para Detecção de Biomoléculas Suportados em Matriz Polimérica

Devido à grande área superficial específica das NPs, há uma tendência natural de elas se agregarem. Portanto uma das estratégias adotadas a fim de se evitar este problema e mantê-las estáveis, é suportá-las em matriz polimérica. Neste sentido, a CB tem se mostrado um suporte promissor para a deposição de AuNPs. As estratégias empregadas a fim de se minimizar ainda mais as chances de agregação das AuNPs neste caso incluem a modificação da superfície das AuNPs [56].

Recentemente biossensores baseados em CB-Au vêm sendo desenvolvidos e estudos demonstram que estes dispositivos podem atingir limites de detecção de moléculas inferior a $1 \mu\text{M}$ [57]. Ainda neste cenário, Morales-Narváez e colaboradores (2015) [58] desenvolveram plataformas colorimétricas para a detecção de cianeto e tiouréia, cujo ponto de saturação foi determinado em 4,5 e 8ppm, respectivamente. Estes estudos revelam que biossensores específicos suportados em CB podem ser atraentes alternativas para a detecção e monitoramento de biomoléculas e microrganismos.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

A presente seção do trabalho tem como objetivo geral a obtenção de um biossensor plasmônico baseado em AuNPs para imobilização em superfície de CB, uma plataforma sensora modelo para possíveis aplicações biomédicas.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Preparar AuNPs via redução por citrato utilizando HAuCl_4 (ácido tetracloroáurico) como precursor;
- II. Funcionalizar as AuNPs com L-cisteína (L-Cys);
- III. Suportar o biossensor à matriz de CB.

3. Materiais e Métodos

3.1 Preparação das AuNPs

As AuNPs foram obtidas pelo Método de Turkevich ^[59], também conhecido como Método Citrato. Aqueceu-se água ultrapura até a temperatura de ebulição. Uma suspensão aquosa de AuNPs foi obtida pela injeção de uma solução de HAuCl₄ 1,6% (m/V), seguido da adição de uma solução de citrato de sódio 2% (m/V) recentemente preparada à T.A. A proporção mássica entre o citrato e a solução de HAuCl₄ adicionada foi de 1:2. Após a injeção, o sistema foi mantido em aquecimento por 5 minutos. Feito isto, o sistema foi resfriado à T.A. A suspensão foi acondicionada em frasco âmbar e mantida em geladeira.

O citrato de sódio adicionado à solução reduziu o ouro metálico à ouro coloidal na forma de NPs e agiu como estabilizante. Visto que o citrato possui carga negativa, a superfície das NPs passa a compreender esta mesma carga. Portanto a repulsão eletrostática entre as AuNPs impede que elas se agreguem, mantendo-as estabilizadas.

3.2 Preparação das L-Cys-AuNPs

Para a preparação das NPs modificadas, a L-Cys foi incorporada à superfície das AuNPs *in situ*, ou seja, durante a síntese das próprias AuNPs utilizando-se citrato de sódio como agente redutor. Cinco condições reacionais foram testadas a fim de se obter as L-Cys-AuNPs, de maneira que os seguintes parâmetros foram avaliados: ordem de adição dos reagentes e quantidade do agente redutor.

a) Condição 1:

Aqueceu-se água ultrapura até a temperatura de ebulição. Uma suspensão aquosa de L-Cys-AuNPs foi obtida pela injeção de uma solução de HAuCl₄ 1,6% (m/V), seguido da adição de uma solução de citrato de sódio 1,5% (m/V) recentemente preparada à T.A. contendo L-Cys. A proporção mássica entre a L-Cys, o citrato e a solução de HAuCl₄ adicionada foi de 1:4:8. Após a injeção, o sistema foi mantido em aquecimento por 5 minutos. Feito isto, o sistema foi resfriado à T.A. A suspensão foi acondicionada em frasco âmbar e mantida em geladeira.

b) Condição 2:

Em relação à Condição 1, alterou-se a ordem de adição dos reagentes. Aqueceu-se água ultrapura até a temperatura de ebulição. Uma suspensão aquosa de L-Cys-AuNPs foi obtida pela injeção de uma solução de citrato de sódio 1,5% (m/V) recentemente preparada à T.A. contendo L-Cys, seguido da adição de uma

solução de HAuCl_4 1,6% (m/V). A proporção mássica entre a L-Cys, o citrato e a solução de HAuCl_4 adicionada foi exatamente à mesma da condição anterior: 1:4:8. Após a injeção, o sistema foi mantido em aquecimento por 5 minutos. Feito isto, o sistema foi resfriado à T.A. A suspensão foi acondicionada em frasco âmbar e mantida em geladeira.

c) Condição 3:

Em relação à Condição 2, manteve-se a ordem de adição dos reagentes, mas aumentou-se em mais de trinta vezes a quantidade de citrato adicionada. Aqueceu-se água ultrapura até a temperatura de ebulição. Uma suspensão aquosa de L-Cys-AuNPs foi obtida pela injeção de uma solução de citrato de sódio 50% (m/V) recentemente preparada à T.A. contendo L-Cys, seguido da adição de uma solução de HAuCl_4 1,6% (m/V). A proporção mássica entre a L-Cys, o citrato e a solução de HAuCl_4 adicionada neste caso foi de 1:133:8. Após a injeção, o sistema foi mantido em aquecimento por 5 minutos. Feito isto, o sistema foi resfriado à T.A. A suspensão foi acondicionada em frasco âmbar e mantida em geladeira.

d) Condição 4:

Em relação à Condição 3, manteve-se a ordem de adição dos reagentes, mas diminuiu-se em três vezes a quantidade de citrato adicionada. Aqueceu-se água ultrapura até a temperatura de ebulição. Uma suspensão aquosa de L-Cys-AuNPs foi obtida pela injeção de uma solução de citrato de sódio 16,3% (m/V) recentemente preparada à T.A. contendo L-Cys, seguido da adição de uma solução de HAuCl_4 1,6% (m/V). A proporção mássica entre a L-Cys, o citrato e a solução de HAuCl_4 adicionada neste caso foi de 1:44:8. Após a injeção, o sistema foi mantido em aquecimento por 5 minutos. Feito isto, o sistema foi resfriado à T.A. A suspensão foi acondicionada em frasco âmbar e mantida em geladeira.

e) Condição 5:

Em relação à Condição 4, alterou-se a ordem de adição dos reagentes (retomou-se a ordem de adição da Condição 1) e diminuiu-se em pouco mais de cinco vezes a quantidade de citrato adicionada. Aqueceu-se água ultrapura até a temperatura de ebulição. Uma suspensão aquosa de L-Cys-AuNPs foi obtida pela injeção de uma solução de HAuCl_4 1,6% (m/V), seguido da adição de uma solução de citrato de sódio 3% (m/V) recentemente preparada à T.A. contendo L-Cys. A proporção mássica entre a L-Cys, o citrato e a solução de HAuCl_4 adicionada foi de 1:8:8. Após a injeção, o sistema foi mantido em aquecimento por 5 minutos. Feito

isto, o sistema foi resfriado à T.A. A suspensão foi acondicionada em frasco âmbar e mantida em geladeira.

3.3 Técnicas Empregadas na Caracterização dos Materiais

a) Microscopia Eletrônica de Transmissão

O diâmetro e a morfologia das AuNPs e das L-Cys-AuNPs foram determinados via Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). O equipamento utilizado para a obtenção das imagens foi microscópio eletrônico de transmissão *Jeol JEM2100 LaB₆ 200 kV*. Uma alíquota da amostra foi diluída e homogeneizada com o auxílio de um banho ultra-som, gotejada em uma grade para transmissão de carbono ultrafino e esta foi submetida à vácuo para secagem. Para a medição do tamanho das NPs e determinação de seu diâmetro médio, utilizou-se as imagens obtidas junto ao software livre *ImageJ*.

b) Espectroscopia Eletrônica na Região do UV-Visível

A preparação das NPs foi monitorada através da técnica de LSPR com o espectrômetro de UV-Visível da *Agilent Technologies®* modelo Cary 60. As medidas de absorção foram obtidas no intervalo de 200 a 800 nm com resolução de 1 nm e taxa de varredura de 600 nm/min, utilizando-se cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

c) Espalhamento Dinâmico de Luz

O diâmetro hidrodinâmico e a distribuição das AuNPs bem como seu potencial zeta, foram determinados através do Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*) com o analisador óptico de partícula *Zetasizer Nano ZS* da *Malvern Instruments* modelo ZEN3600. Uma alíquota de 400 µL da amostra foi diluída em 1800 µL de água Milli-Q, homogeneizada e aplicada na cubeta do aparelho. As análises foram realizadas em triplicata. As curvas de distribuição do diâmetro hidrodinâmico das suspensões foram geradas no software *Zetasizer Nano APS* versão 7.10, da *Malvern*.

4. Resultados

4.1 Caracterização das AuNPs

A **Figura 29** apresenta o espectro de absorção UV-Vis das NPs sintetizadas e a suspensão final obtida, a qual apresentou coloração vermelha característica das AuNPs esféricas. A curva exibe uma banda plasmônica larga e assimétrica, indício de que há dispersão no tamanho das AuNPs, com máximo de absorção em 525 nm. Este resultado se mostra compatível com o descrito na literatura [60].

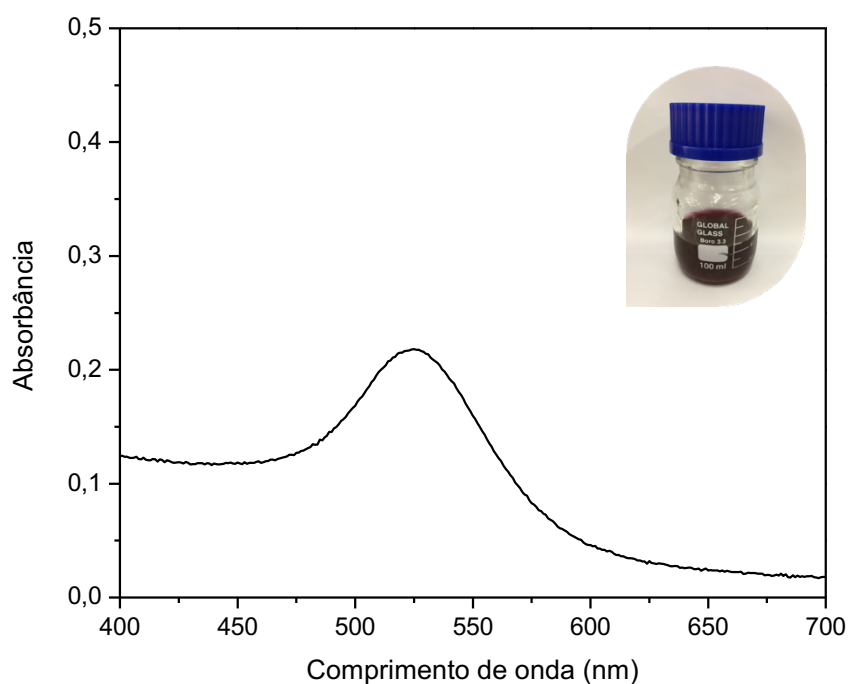


Figura 29. Espectro UV-vis e solução coloidal das AuNPs.

A **Figura 30** a seguir exibe imagens obtidas por MET das AuNPs sintetizadas: vê-se que elas apresentam morfologia esférica. Para a determinação de seu diâmetro médio, tomou-se a medição de 166 NPs – a compilação destes dados é apresentada em forma de histograma na **Figura 31**.

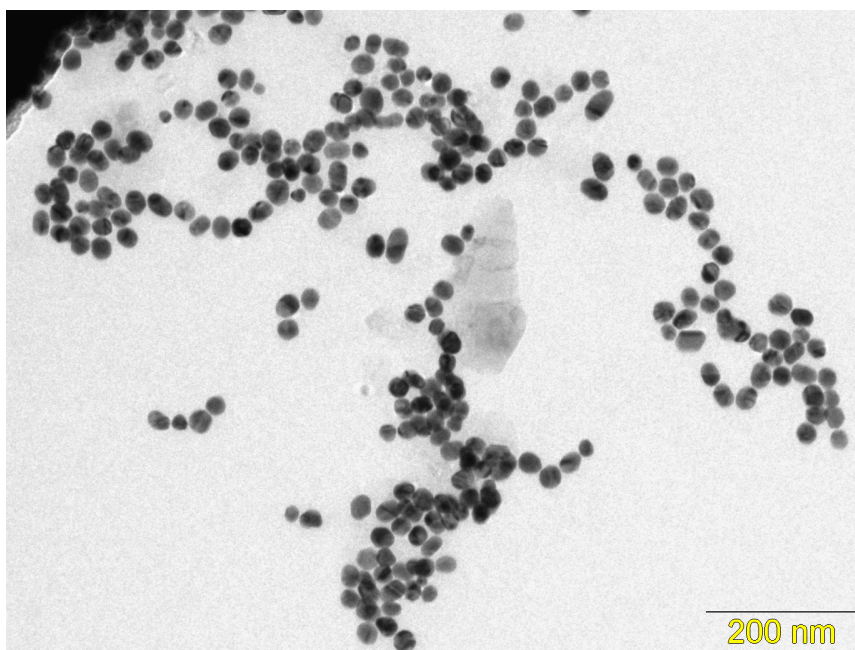


Figura 30. Imagem obtida por MET das AuNPs tomando-se por referência a barra com escala de 200 nm.

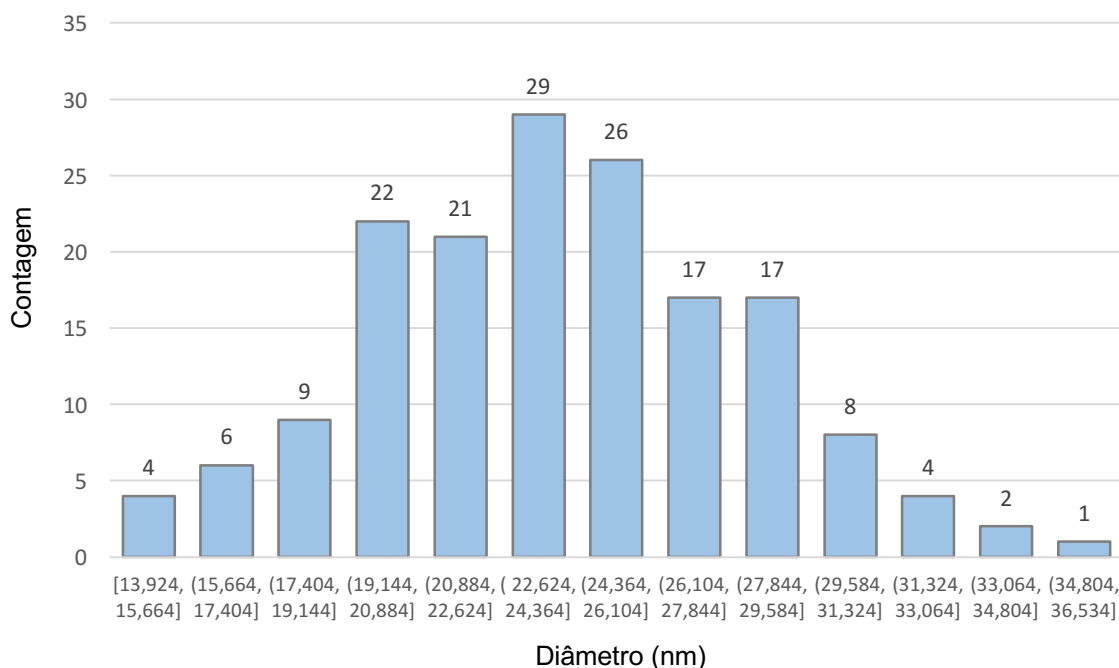


Figura 31. Histograma de distribuição do diâmetro das AuNPs sintetizadas.

De acordo com a análise dos dados, as AuNPs sintetizadas possuem diâmetro médio de $24,0 \pm 4,2$ nm. Ainda, observa-se que NPs apresentaram tamanho controlado com máximo de 36,5 nm e mínimo de 13,9 nm, de maneira que

79,5% da população apresentou diâmetro de 19,1 a 27,8 nm, indício de que a síntese foi relativamente bem controlada e a metodologia aplicada, adequada.

A **Figura 32** a seguir exibe as curvas geradas via DLS da distribuição do diâmetro hidrodinâmico das AuNPs em solução.

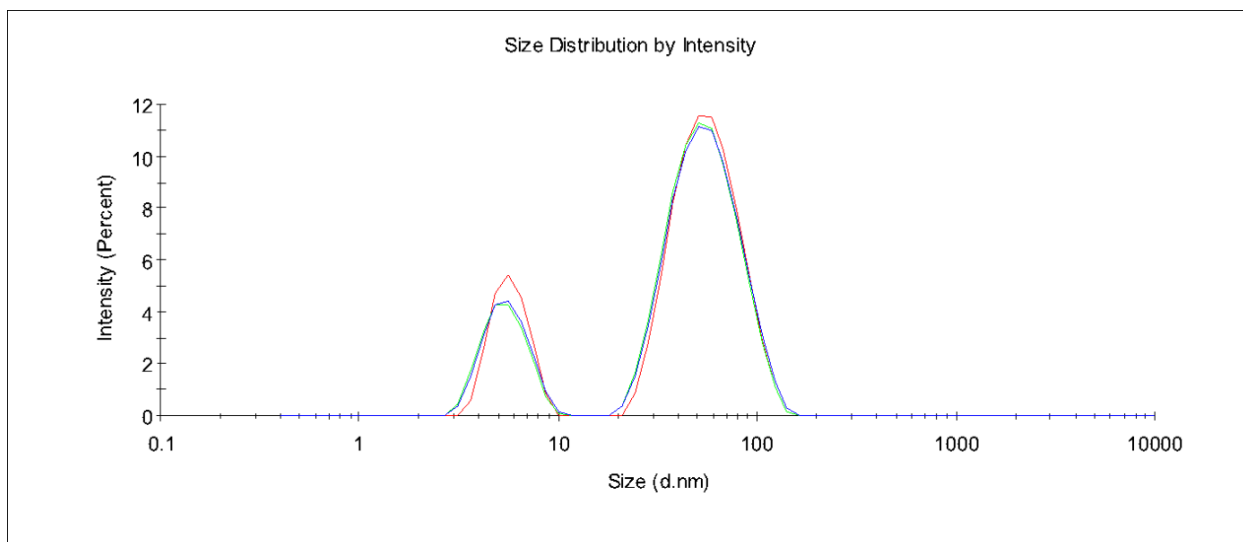


Figura 32. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das AuNPs.

As AuNPs possuem diâmetro hidrodinâmico médio de 24,22 nm. Neste caso, este valor não representa de forma adequada o referido parâmetro haja visto que a dispersão de AuNPs apresenta duas populações: a maior delas, que corresponde à 79,5% das NPs, apresenta diâmetro hidrodinâmico na faixa de 18,2 – 164,2 nm (faixa ampla), enquanto o restante da população apresenta menor diâmetro hidrodinâmico, na faixa de 2,7–11,7 nm. Considerando a população mais expressiva, tem-se que o diâmetro obtido via DLS mostra-se bastante superior ao diâmetro médio determinado a partir das imagens de TEM. Isto porque o diâmetro hidrodinâmico inclui as camadas de contra-íons e de hidratação, enquanto aquele obtido via imagens de TEM considera apenas os núcleos inorgânicos.

O valor do potencial zeta, que é o potencial eletrostático gerado pela interação dos íons na superfície das NPs, está intimamente relacionado à estabilidade da suspensão coloidal ^[61]. Nanopartículas com valores de potencial zeta maiores que +25 mV ou menores que -25 mV, normalmente têm alto grau de estabilidade. O potencial zeta das AuNPs produzidas determinado em $-31,10 \pm 8,94$ mV, reflete o alto grau de estabilidade da suspensão.

A **Figura 33** a seguir apresenta a imagem obtida por MEV da CB após ser embebida na solução das AuNPs.

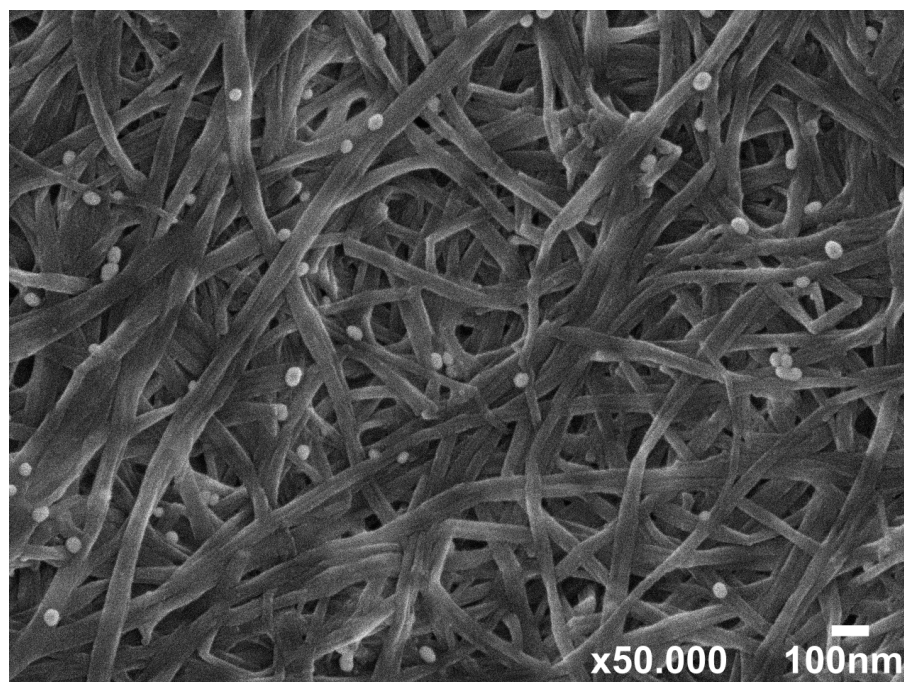


Figura 33. Imagem de MEV das AuNPs aderidas à superfície da CB nativa.

Observa-se na imagem acima que as AuNPs estão homogeneamente distribuídas sobre a matriz de CB, o que sugere que este suporte contribui para impedir a agregação das nanopartículas, conforme aponta a literatura ^[56].

4.2 Caracterização das L-Cys-AuNPs

As **Figuras 34-38** apresenta os espectros de absorção UV-Vis das partículas sintetizadas e a suspensão final obtida, as quais apresentam coloração distinta das AuNPs.

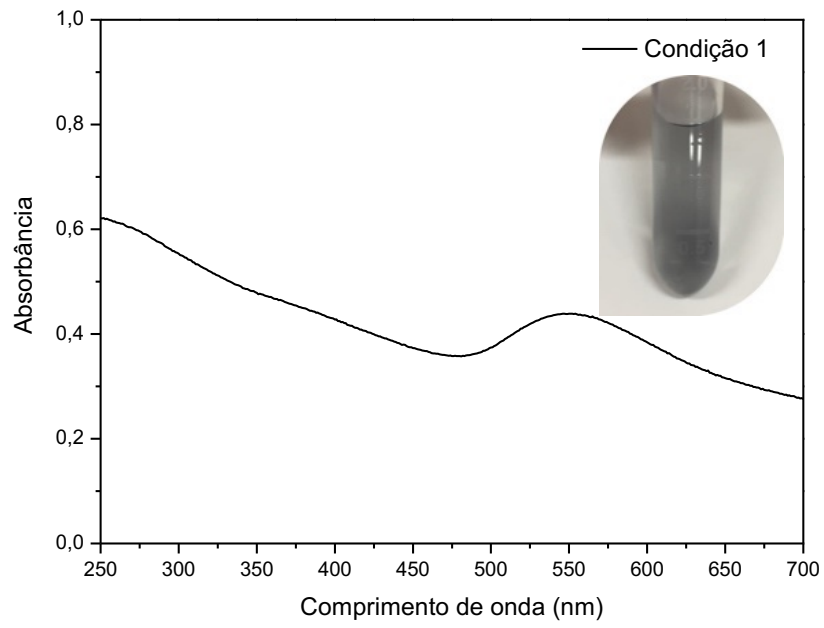


Figura 34. Espectro UV-vis e solução coloidal das partículas – Condição 1.

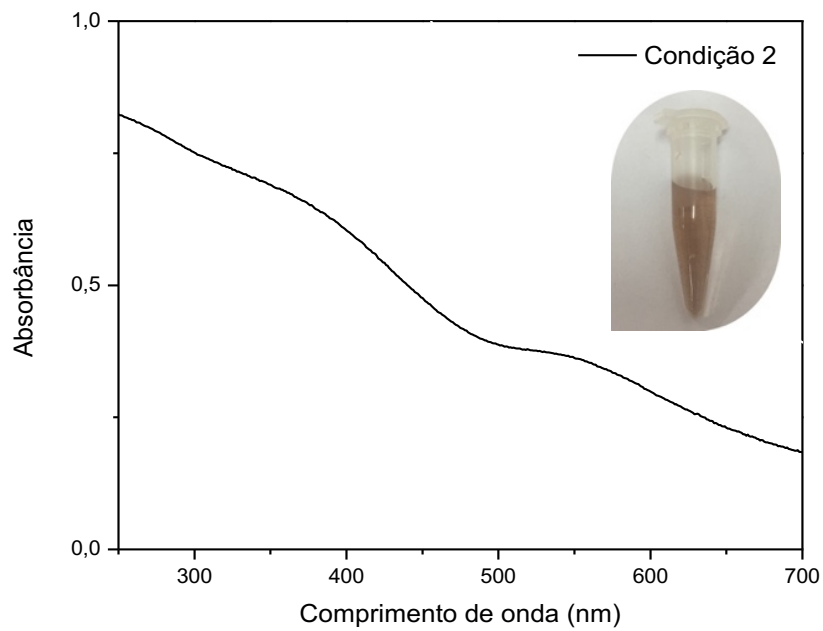


Figura 35. Espectro UV-vis e solução coloidal das partículas – Condição 2.

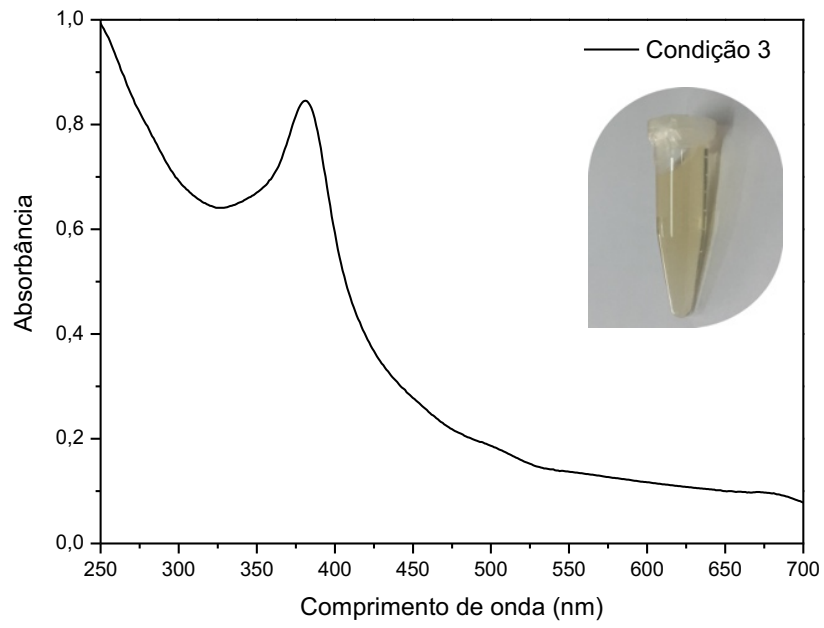


Figura 36. Espectro UV-vis e solução coloidal das partículas – Condição 3.

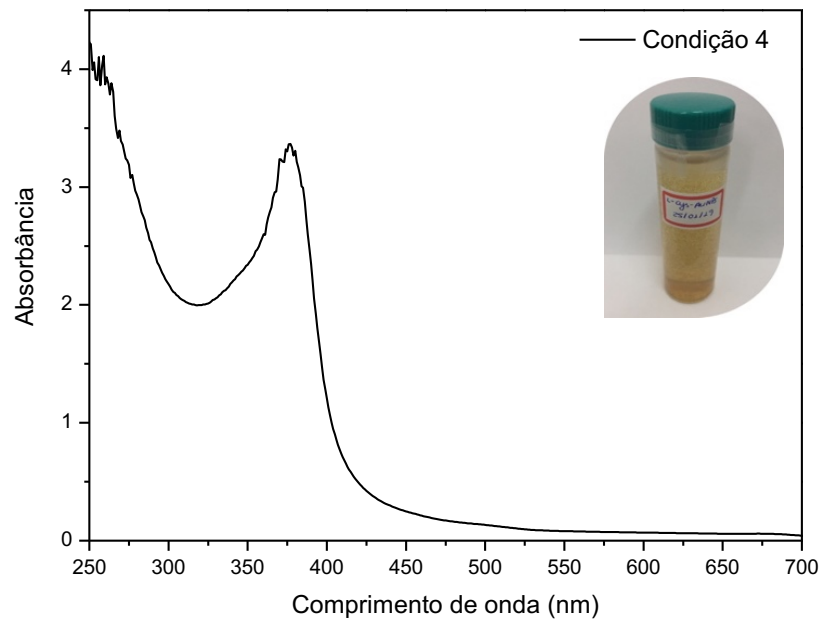


Figura 37. Espectro UV-vis e solução coloidal das partículas – Condição 4.

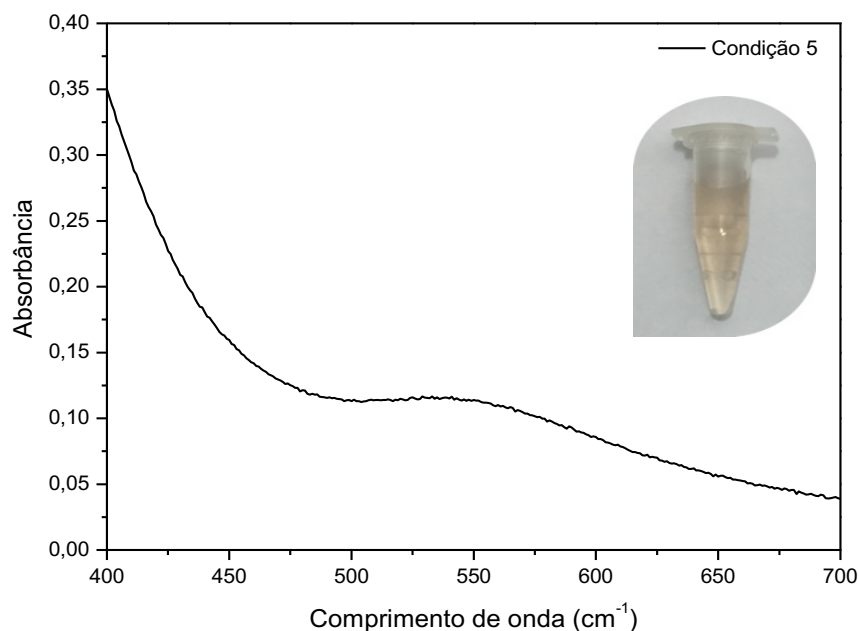


Figura 38. Espectro UV-vis e solução coloidal das partículas – Condição 5.

As partículas produzidas na Condição 1 apresentaram coloração roxa, conforme se verifica na figura anterior. Esta mudança de coloração é acompanhada pelo deslocamento da banda de absorção para um comprimento de onda mais elevado (efeito batocrômico) com máximo de absorção em 550 nm, conforme se observa no espectro UV-Vis. A coloração e o espectro de absorção das partículas produzidas obtida nesta condição está de acordo com os dados reportados na literatura no caso das AuNPs funcionalizadas com L-Cys ^[54]. As partículas produzidas na Condição 5 embora de coloração marrom, apresentaram banda no espectro UV-Vis com perfil semelhante àquele apresentado pelas partículas produzidas na Condição 1, com máximo de absorção também em 550 nm.

As partículas produzidas nas Condições 3 e 4, por sua vez, apresentaram coloração amarela. Seus espectros de absorção UV-Vis exibiram uma banda na mesma região, com máximo em 380 nm e 374 nm para as Condições 3 e 4, respectivamente.

As partículas produzidas na Condição 2, por sua vez, apresentaram coloração marrom. No espectro UV-Vis, ao contrário do que ocorre nos demais casos, observa-se a presença de duas bandas, embora fracas: nas regiões de 380 nm e 550 nm.

A técnica de DLS é a mais utilizada na caracterização físico-química de colóides. Ela permite a medição de flutuações no tempo da intensidade de luz espalhada, causadas pelos movimentos das partículas em solução. Assim, esta técnica permite extrair informações de distribuição de tamanhos de partícula, interações e estabilidade de suspensões [62].

As **Figuras 39-43** exibem as curvas de distribuição do diâmetro hidrodinâmico das suspensões de partículas.

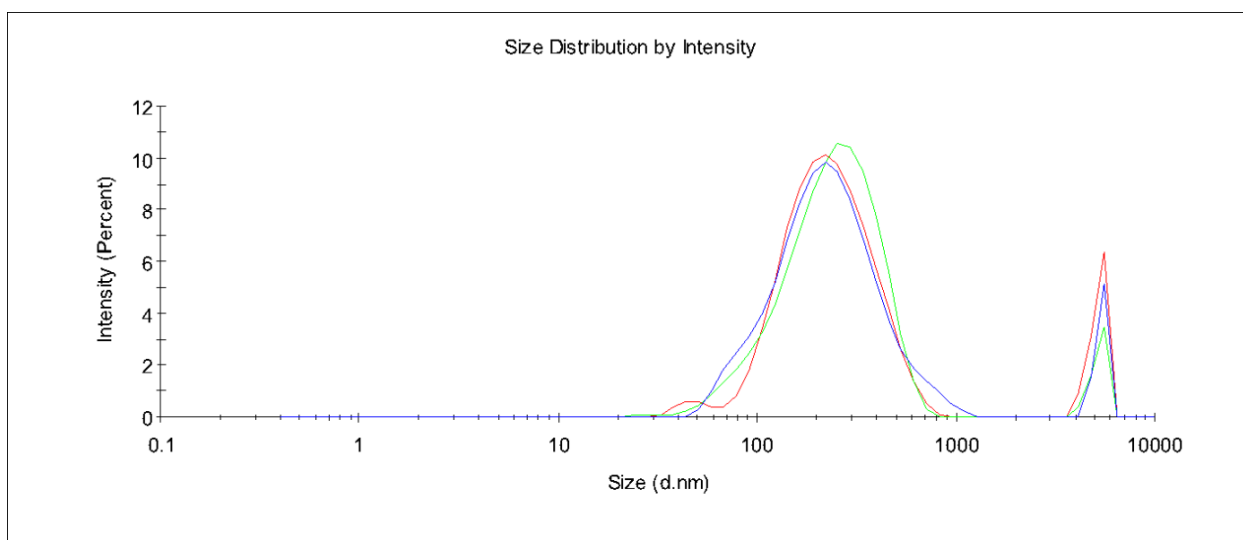


Figura 39. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das partículas – Condição 1.

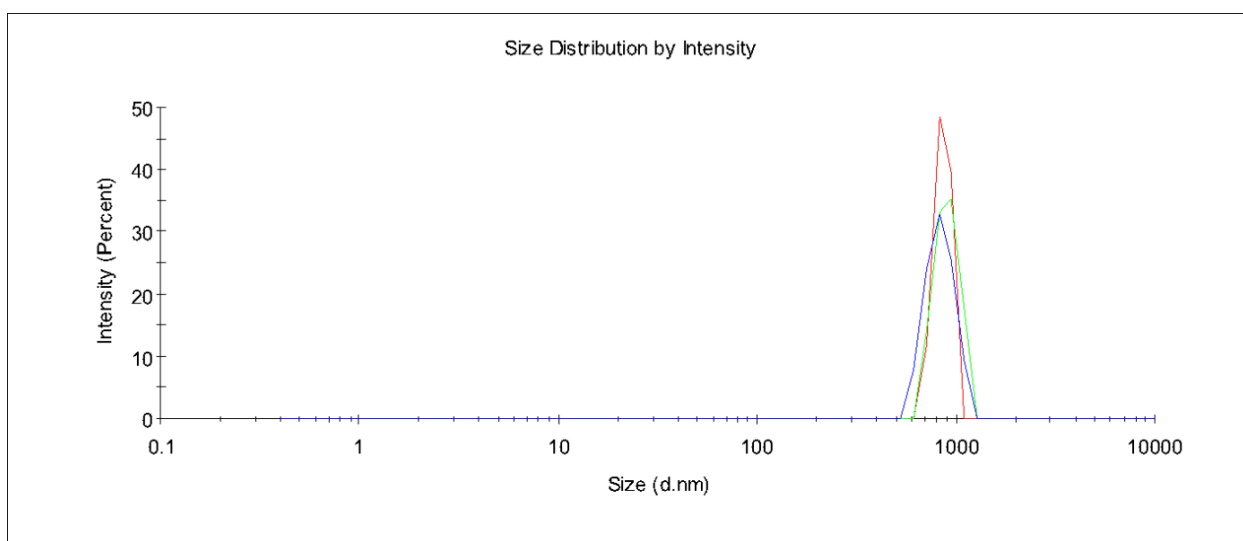


Figura 40. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das partículas – Condição 2.

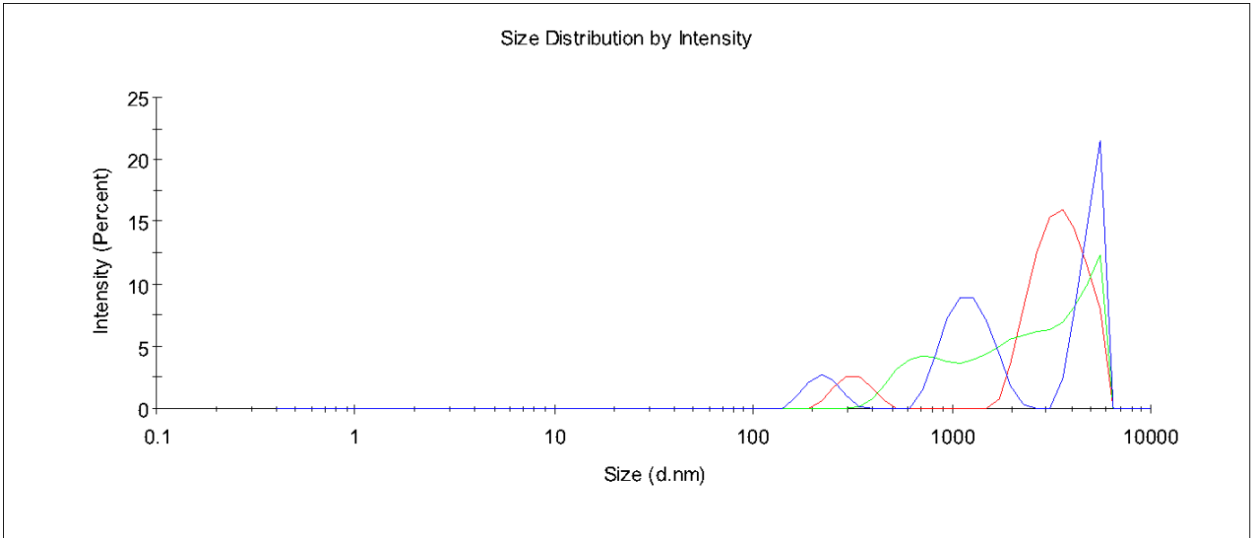


Figura 41. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das partículas – Condição 3.

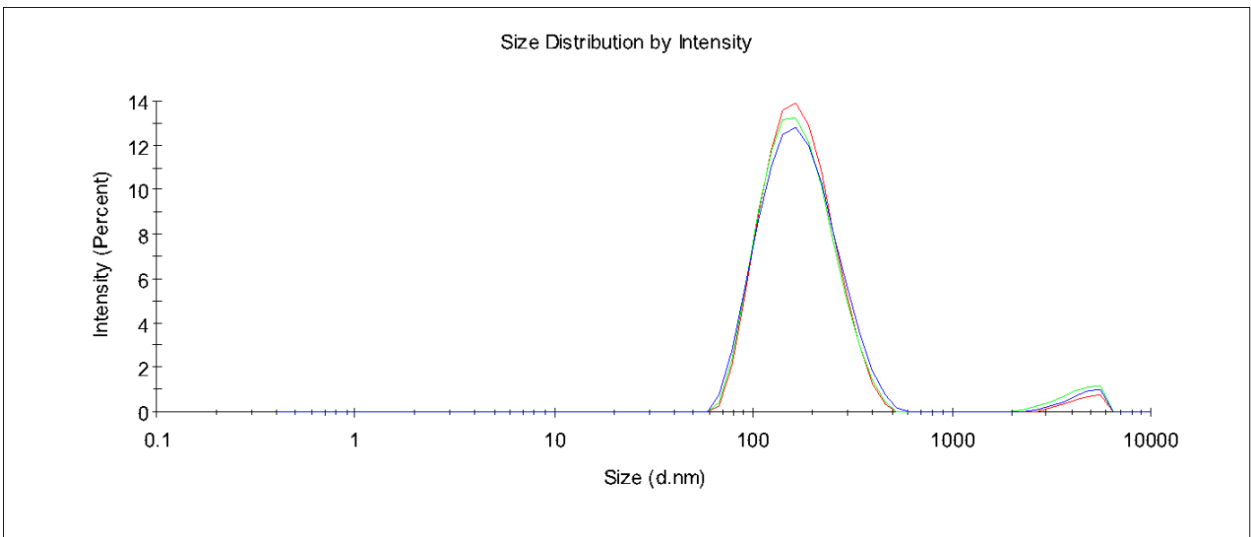


Figura 42. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das partículas – Condição 4.

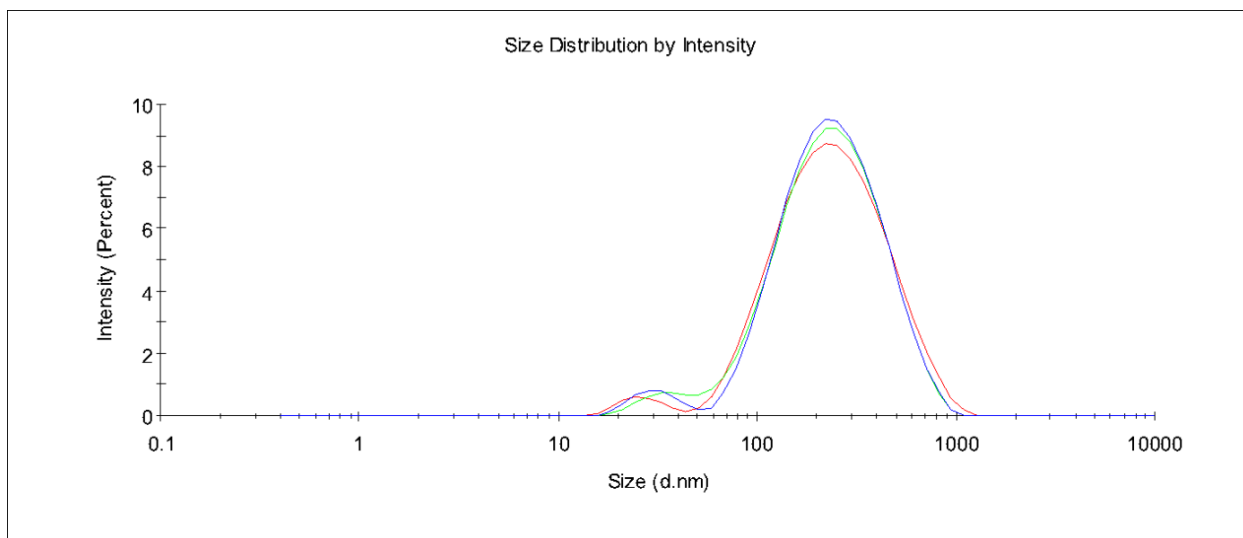


Figura 43. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das partículas – Condição 5.

As partículas produzidas na Condição 1 apresentam duas populações, de maneira que a população mais expressiva apresenta diâmetro hidrodinâmico na faixa de 32,7 – 1.281,0 nm. O potencial zeta da suspensão foi determinado em $8,47 \pm 4,01$ mV, valor este que reflete o baixo grau de estabilidade da suspensão. Este fato pôde ser confirmado poucos dias após a síntese, quando notou-se que as partículas não se mantiveram dispersas na solução, mas formaram diversos pontos de agregação. Haja visto o resultado insatisfatório em termos de estabilidade das partículas produzidas, para a Condição 2 inverteu-se a ordem de adição dos reagentes e avaliou-se o referido parâmetro.

A Condição 2, por sua vez, gerou partículas mais estáveis, cujo potencial zeta foi determinado em $-23,60 \pm 2,75$ mV. Quanto à distribuição do diâmetro hidrodinâmico, este processo gerou uma única população que apresentou valor maior, na faixa de 531,2 – 1.281,0 nm. Dado a maior estabilidade da suspensão neste caso, para a Condição 3 em relação à esta, manteve-se a mesma ordem de adição dos reagentes, mas aumentou-se expressivamente a quantidade adicionada de agente redutor/estabilizante a fim de se obter partículas com menor diâmetro hidrodinâmico, e, portanto, menores.

As partículas produzidas na Condição 3 apresentaram potencial zeta satisfatório, de $-40,70 \pm 5,57$ mV. Apesar disso, a população de partículas geradas mostrou-se bastante heterogênea em termos de diâmetro hidrodinâmico, que apresentou valor na faixa de 141,8 – 6.439,0 nm. Com o intuito de obter uma

população de partículas mais bem-comportada e homogênea, para a Condição 4 diminui-se a quantidade de agente redutor/estabilizante, porém de maneira que esta ainda se mantivesse maior em relação às Condições 1 e 2.

A Condição 4 levou à obtenção de partículas com potencial zeta de $-28,80 \pm 17,80$ mV. Embora este valor médio de potencial zeta seja considerado adequado, o desvio padrão mostrou-se consideravelmente alto, o que não é o ideal. Neste caso, foi possível observar a agregação das partículas muito rapidamente, ainda durante o processo de resfriamento da suspensão. As partículas produzidas mostraram-se mais homogêneas em relação à condição anterior em termos de diâmetro hidrodinâmico, apresentando duas populações, de maneira o diâmetro hidrodinâmico da população mais expressiva foi determinado na faixa de 58,8 – 531,2 nm.

Entre os procedimentos realizados, tem-se que as Condições 1 e 4 apresentaram os resultados mais satisfatórios em termos do diâmetro hidrodinâmico almejado, ou seja, suas populações mais expressivas apresentaram, entre as condições testadas, o valor mais próximo da faixa determinada para as AuNPs. Especificamente, a Condição 4 foi a que apresentou a faixa mais estreita, enquanto a Condição 1 foi a única com a coloração e a banda de absorção próximas às apresentadas pelas L-Cys-AuNPs apontadas na literatura ^[54,55]. Desta maneira para a Condição 5, retomou-se a ordem de adição dos reagentes da Condição 1. Porém, visando uma faixa mais estreita de diâmetro hidrodinâmico conforme a apresentada pela Condição 4, aumentou-se a quantidade de citrato.

A Condição 5 gerou partículas estáveis com potencial zeta de $-32,20 \pm 7,21$ mV. Embora não tenha apresentado a faixa mais estreita de diâmetro hidrodinâmico, o perfil das curvas obtidas nesta condição foi aquele que mais se assemelha ao das curvas geradas pelas AuNPs. Neste caso, a população mais expressiva apresentou diâmetro hidrodinâmico na faixa de 50,7 – 1.281,0 nm, próximo ao da Condição 1.

Os dados apresentados nesta seção encontram-se compilados na **Tabela 6** a seguir.

Tabela 6. Condições reacionais de síntese e resultados das análises das NPs.

	AuNPs	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5
Citrato/Vol. solução final	0,03%	0,03%	0,03%	1%	0,3%	0,06%
Citrato: Au (m:m)	1:2	1:2	1:2	15:1	5:1	1:1
Cys:Citrato: Au (m:m:m)	-	1:4:8	1:4:8	1:133:8	1:44:8	1:8:8
Ordem de adição	1. Au 2. Citrato	1. Au 2. Cit. + Cys	1. Cit. + Cys 2. Au	1. Cit. + Cys 2. Au	1. Cit. + Cys 2. Au	1. Au 2. Cit. + Cys
Potencial Zeta (mV)	-31,10 ± 8,94	-8,47 ± 4,01	-23,60 ± 2,75	-40,70 ± 5,57	-28,80 ± 17,8	-32,20 ± 7,21
Raio Hidrodin. (nm)	18,2 - 164,2 (79,5%) 2,7 - 11,7 (20,5%)	32,7 - 1.281,0 (93,3%) 3.580,0 - 6.439,0 (6,7%)	531,2 - 1.281,0 (100%)	141,8 - 6.439,0 (100%)	58,8 - 531,2 (96,6%) 2.305,0 - 6.439,0 (3,4%)	50,7 - 1.281,0 (96,2%) 15,7 - 70,7 (3,8%)
UV-Vis	Banda em 525 nm	Banda em 550 nm	Não apresentou banda	Banda em 380 nm	Banda em 376 nm	Banda em 550 nm

Haja visto que as partículas produzidas nas Condições 1 e 5 apresentaram uma única banda em 550 nm e raio hidrodinâmico próximo ao exibido pelas L-Cys-AuNPs esféricas de diâmetro médio de 24 ± 2 nm conforme reportado na literatura [54,55], elas foram analisadas por MET - As **Figuras 44 e 45** exibem tais imagens.

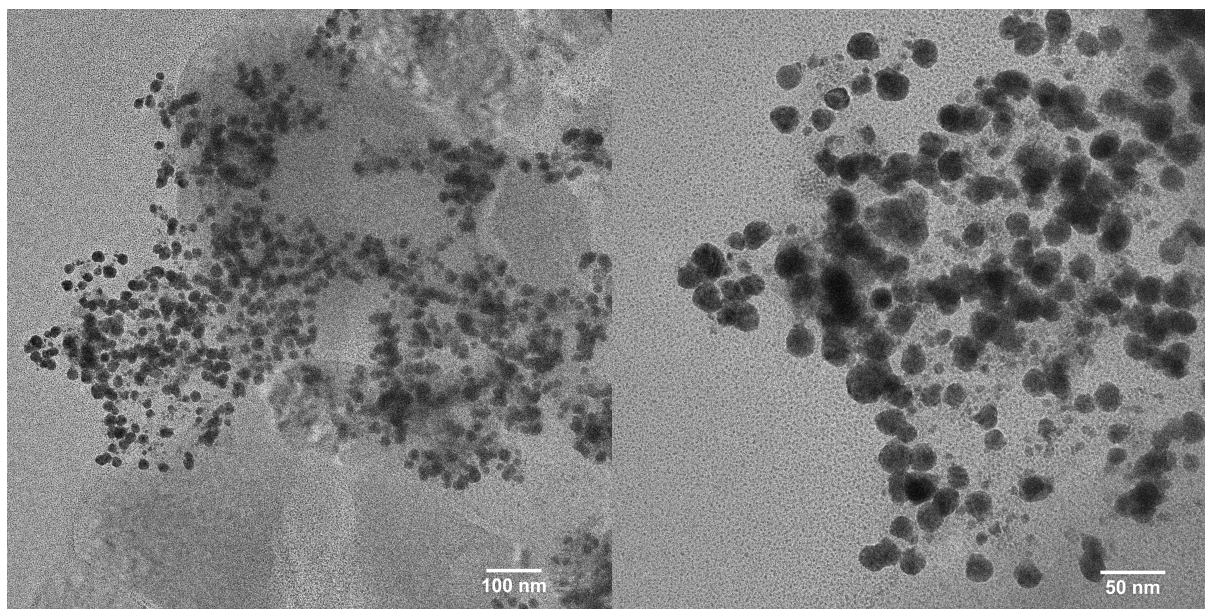


Figura 44. Imagem obtida por MET das NPs tomando-se por referência barras com escala de 100 nm e 50 nm - Condição 1.

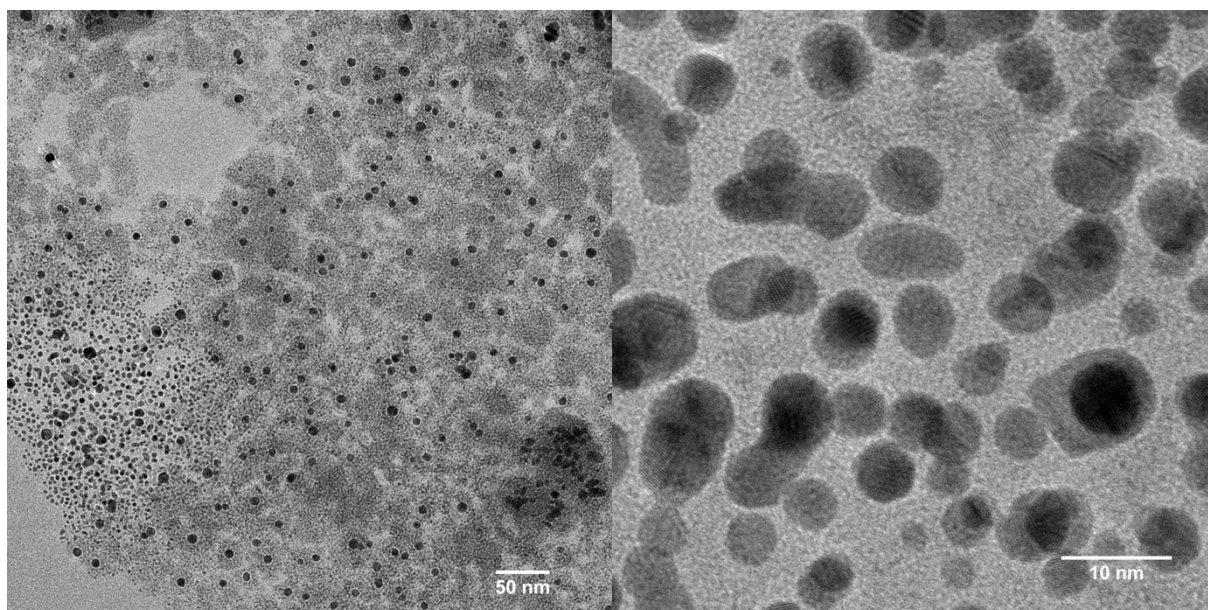


Figura 45. Imagem obtida por MET das NPs tomando-se por referência barras com escala de 100 nm e 50 nm - Condição 5.

As L-Cys-AuNPs sintetizadas na Condição 1, conforme reportado por Petean e colaboradores (2008) ^[63], se organizam de uma maneira mais complexa e tendem a se agregar, ao contrário das AuNPs que se arranjam de forma mais linear. Este comportamento pode ser explicado principalmente pelas interações eletrostáticas do tipo zwitterion que ocorrem entre os grupos terminais amina e carboxila presentes moléculas de cisteína.

As L-Cys-AuNPs sintetizadas na Condição 5, por sua vez, mostram-se mais dispersas, apresentando poucos pontos de aglomeração. Neste caso, é possível observar o núcleo inorgânico (Au, porção mais escura) recoberto por um invólucro orgânico.

Para a determinação do diâmetro médio destas L-Cys-AuNPs, tomou-se a medição de 150 NPs obtidas via Condição 1 e 66 NPs via Condição 5. Ainda, no caso desta última, foi possível ainda determinar o tamanho médio do núcleo inorgânico das NPs, para o qual tomou-se a medição de 150 núcleos. A compilação destes dados é apresentada em forma de histogramas nas **Figuras 46-48**.

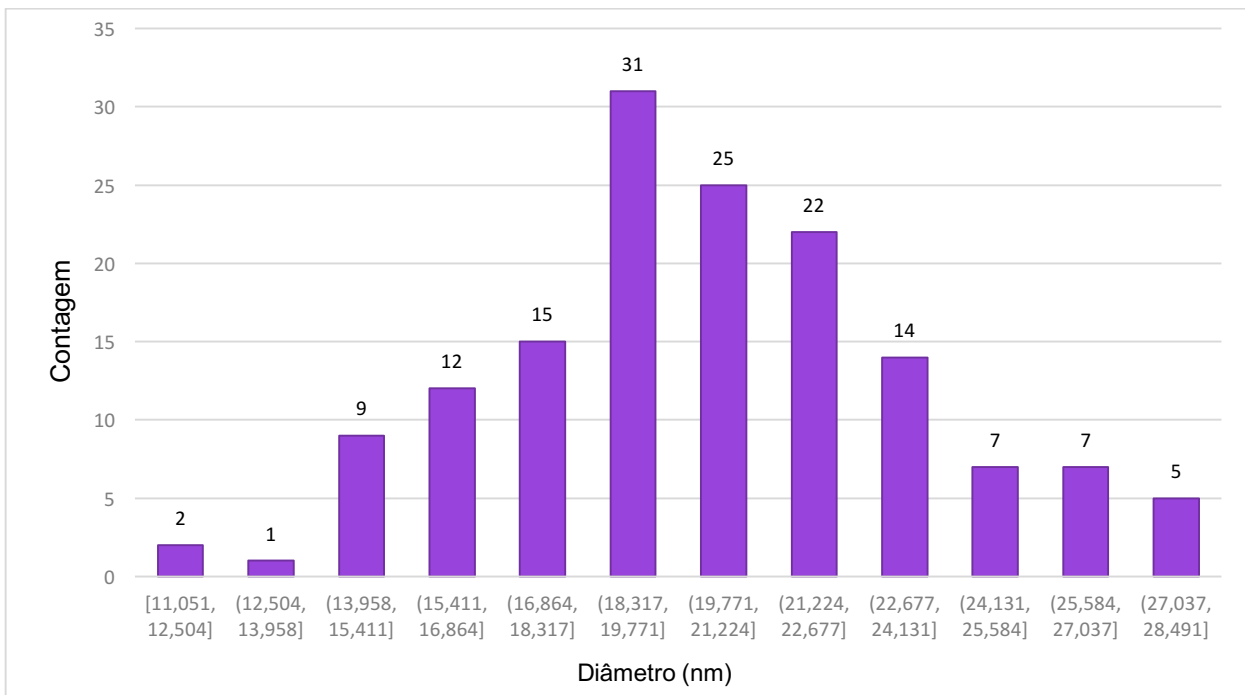


Figura 46. Histograma de distribuição do diâmetro das L-Cys-AuNPs sintetizadas – Condição 1.

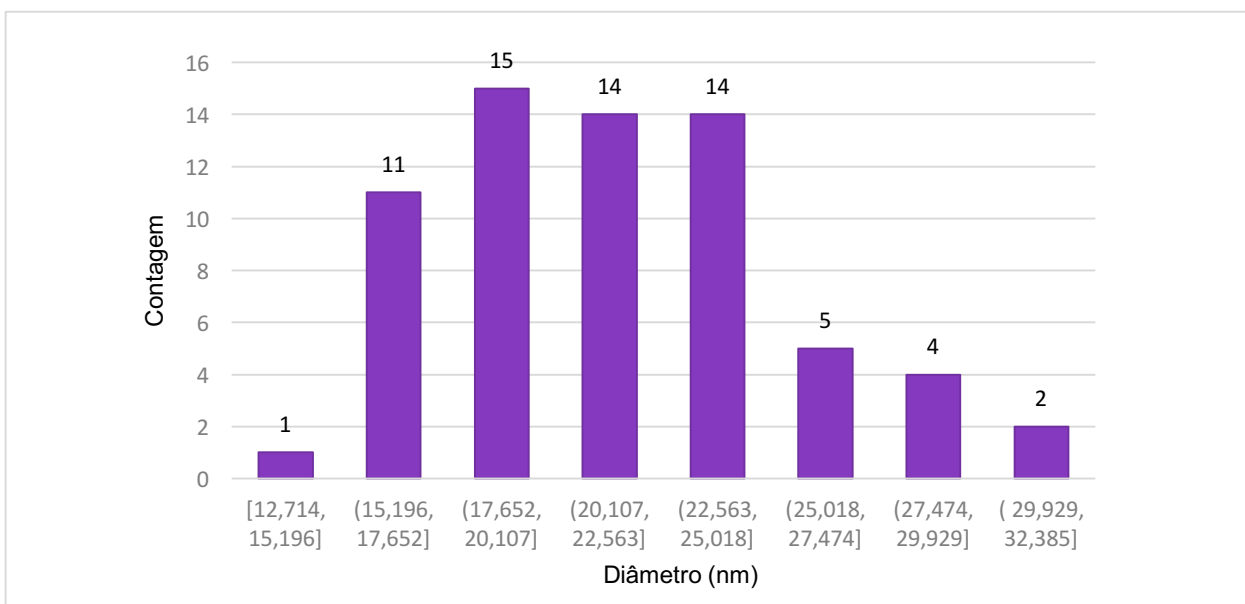


Figura 47. Histograma de distribuição do diâmetro das L-Cys-AuNPs sintetizadas – Condição 5.

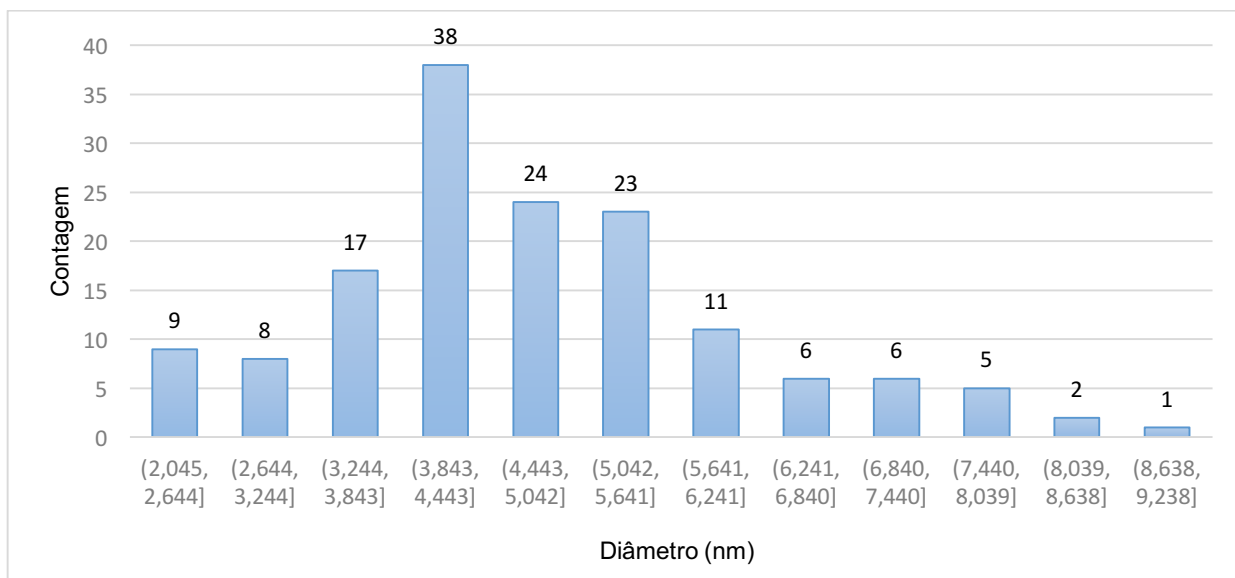


Figura 48. Histograma de distribuição do diâmetro do núcleo inorgânico das L-Cys-AuNPs sintetizadas –Condição 5.

De acordo com a análise dos dados, as L-Cys-AuNPs sintetizadas na Condição 1 possuem diâmetro médio de $20,2 \pm 3,3$ nm. Ainda, observa-se que NPs apresentaram tamanho controlado com máximo de 28,5 nm e mínimo de 11,1 nm, de maneira que 79,3% da população apresentou diâmetro de 15,4 a 24,1 nm.

As L-Cys-AuNPs sintetizadas na Condição 5, por sua vez, mostraram-se pouco maior: apresentaram diâmetro médio de $21,5 \pm 4,1$ nm, com máximo de 32,4 nm e mínimo de 12,7 nm, de modo que 81,8% da população apresentou diâmetro de 15,2 a 25,0 nm. Neste caso o diâmetro médio do Au foi determinado em $4,7 \pm 1,4$ nm.

Estudos conduzidos por Naz (2016) ^[64] e por Liebig (2018) ^[65] e colaboradores, apontam que a formação de aglomerados de AuNPs de até 2 nm, resultam em uma banda intensa em 380 nm no espectro de absorção UV-Vis. Assim, presume-se que as partículas produzidas nas Condições 3 e 4, que foram aquelas onde citrato foi adicionado em maior proporção, são na realidade AuNPs não funcionalizadas com L-Cys, que apresentam diâmetro médio próximo à 2 nm.

Haja visto que as partículas produzidas via Condição 2 não apresentou banda em 550 nm, acredita-se que também estas não são AuNPs funcionalizadas com L-Cys. Ainda, visto que as propriedades ópticas das AuNPs são dependentes de diversos parâmetros além de tamanho, como formato, solvente e estado de agregação, é possível que as partículas produzidas via Condição 2, sejam distintas

em termos de formato com relação às produzidas nas Condições 3 e 4. Assim, a princípio têm-se que, entre as metodologias aplicadas, àquelas referentes as Condições 1 e 5 onde a adição de HAuCl_4 precedeu a adição do citrato, mostraram-se mais adequadas para a obtenção das L-Cys-AuNPs.

4.3 Protótipo de Plataforma Baseada em CB

Um protótipo de plataforma baseada em CB foi construído com o auxílio de uma impressora com tinteiro de cera. O padrão feito tomando-se por referência uma placa de cultivo de 96 poços foi impresso em cera na superfície de uma membrana de celulose, de forma que as barreiras hidrofóbicas criadas definiram as zonas disponíveis - A **Figura 49** a seguir exibe uma foto do dispositivo.

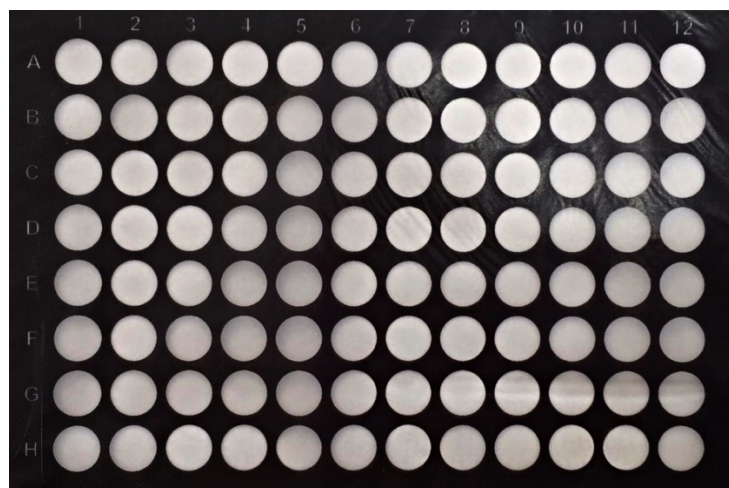


Figura 49. Protótipo de plataforma baseada em CB.

No que tange a utilização do dispositivo enquanto plataforma sensora, é viável o emprego de *Dot Blotting* ^[66] enquanto metodologia de detecção de antígeno.

5. Conclusões do Capítulo

Os resultados obtidos atestam o sucesso na síntese das AuNPs e das L-Cys-AuNPs, conforme apontado pelas caracterizações realizadas. As AuNPs apresentaram morfologia esférica e tamanho controlado e mostraram-se mais ou igualmente estáveis em relação às L-Cys-AuNPs, conforme apontado pela análise de DLS. Particularmente, a adição de HAuCl_4 anterior à de citrato de sódio mostrou-se mais apropriado na síntese das NPs funcionalizadas.

6. Perspectivas

Testar a detecção de *E. coli*. 0157:H7 via *Dot Blotting* através da aplicação direta do antígeno sob as membranas de CB, coradas em um segundo passo pela deposição das L-Cys-AuNPs.

Conclusões Finais

A funcionalização da superfície da CB pela inserção de grupo tiol via silanização com MPTMS, por si só, não foi determinante para melhorar a adesão de fibroblastos sobre o material haja visto que alguns tratamentos promoveram maior adesão celular enquanto outros a prejudicaram.

A funcionalização das AuNPs com L-Cys promoveu deslocamento da banda de absorção na região do ultravioleta de 25 nm para um comprimento de onda maior - de 525 nm para 550 nm. As AuNPs apresentaram morfologia esférica e tamanho controlado e mostraram-se dispersas, ao contrário das L-Cys-AuNPs que embora tenham também exibido tamanho controlado, se organizam de uma maneira mais complexa, formando agregados.

Referências Bibliográficas

1. NG, K. et al. Paper-based cell culture platform and its emerging biomedical applications. **Mater. Today**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2016.
2. BROWN, R. M. Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? **J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.**, v. 42, p. 487-495, 2003.
3. SAPP, M. C. et al. Multilayer 3D Filter Paper Constructs for the Culture and Analysis of Aortic Valvular Interstitial Cells. **Acta Biomater.**, v. 13, p. 199-206, 2015.
4. LANTIGUA, et al. Engineered Paper-Based Cell Culture Platforms. **Adv. Healthcare Mater.**, v. 6, n. 22, p. 1-17, 2017.
5. WU, X. et al. Paper as a scaffold for cell cultures: Teaching an old material new tricks. **MRS Commun.**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2018.
6. DERDA, R. et al. Paper-supported 3D cell culture for tissue-based bioassays. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 106, n. 44, p. 18457–18462, 2009.
7. THOMAS, et al. Nanocellulose, a Versatile Green Platform: From Biosources to Materials and Their Applications. **Chem. Rev.**, v. 118, p. 11606, 2018.
8. COURTENAY, J. C. et al. Surface modified cellulose scaffolds for tissue engineering. **Cellulose**, v. 24, n. 1, p. 253-267, 2016.
9. DE OLIVEIRA BARUD, H. et al. A Multipurpose Natural and Renewable Polymer in Medical Applications: Bacterial Cellulose. **Carb. Pol.**, v. 153, p. 406-420, 2016.
10. BARUD, S. et al. Antimicrobial Bacterial Cellulose-Silver Nanoparticles Composite Membranes. **J. Nanomater.**, n. 10, p. 1-8, 2011.
11. MATSUTAN, M. et al. Adaptive mutation related to cellulose producibility in *Komagataeibacter medellinensis* (*Gluconacetobacter xylinus*) NBRC 3288. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 99, n. 17, p. 7229-7240, 2015.
12. YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. **Bioscience, Biotechnol. and Biochem.**, v. 61, n. 8, p. 1244-1251, 1997.
13. DE OLIVEIRA BARUD, H. et al. Preparation and Characterization of a Bacterial Cellulose/Silk Fibroin Sponge Scaffold for Tissue Regeneration. **Carb. Pol.**, v.

- 128, p. 41-51, 2015.
14. KOIZUMI, et al. Bacterium organizes hierarchical amorphous structure in microbial cellulose. **Eur. Phys. J. E**, v. 26, n. 1-2, p. 137-142, 2008.
 15. PICHETH, et al. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 104, Part A, p. 97–106, 2017.
 16. WILTON, R. L. et al. Microbial Cellulose — Biosynthesis Mechanisms and Medical Applications. In: POLETTI, M.; ORNAGHI JUNIOR, H. L. **Cellulose - Fundamental Aspects and Current Trends**. IntechOpen, 2015.
 17. FERREIRA, M. C. et al. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. **Rev. Bras. Cir. Plást.**, v. 26, n. 4, p. 696-702, 2011.
 18. POURMOUSSA, A. et al. An update and review of cell-based wound dressings and their integration into clinical practice. **Ann. Transl. Med.**, v. 4, n. 23, p. 457, 2016.
 19. ANDRADE, F. K.; DOMINGUES, S. M.; GAMA, F. M. Improving the affinity of fibroblasts for bacterial cellulose using carbohydrate-binding modules fused to RGD. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v. 92, n. 1, p. 9-17, 2010.
 20. TAOKAEW, S.; PHISALAPHONG, M.; NEWBY, B. M. Z. Modification of Bacterial Cellulose with Organosilanes to Improve Attachment and Spreading of Human Fibroblasts. **Cellulose**, v. 22, n. 4, p. 2311-2324, 2015.
 21. FERNANDES, S. C. M. et al. Bioinspired antimicrobial and biocompatible bacterial cellulose membranes obtained by surface functionalization with aminoalkyl groups. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 5, n. 8, p. 3290-3297, 2013.
 22. BRINKER, C. J. Hydrolysis and Condensation of Silicates: Effects on Structure. **J. Non-Cryst. Sol.**, v. 100, p. 31-50, 1988.
 23. ILER, R. K. **The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry**. New York: Wiley, 1979.
 24. FRONE, A. N. et al. Surface Treatment of Bacterial Cellulose in Mild, Eco-Friendly Conditions. **Coatings**, v. 8, n. 221, p. 1-17, 2018.
 25. BEAUMONT, M. et al. A General Aqueous Silanization Protocol to Introduce Vinyl, Mercapto or Azido Functionalities onto Cellulose Fibers and Nanocelluloses. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1427, 2018.

26. LU, F. et al. Flow injection chemiluminescence sensor based on core-shell magnetic molecularly imprinted nanoparticles for determination of sulfadiazine. **Anal. Chim. Acta.**, v. 718, p. 84-91, 2012.
27. PAGE, B.; PAGE, M.; NOEL, C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. **Int. J. Oncology**, v. 3, n. 3, p. 473-476, 1993.
28. KAWANO, Y. Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho. In: CANEVAROLO JR, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber, 2003. p. 17-19.
29. HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. Bookman, v. 6, 2009. 382-412 p.
30. DE SALVI, D. T. B. et al. Self-supported bacterial cellulose/boehmite organic-inorganic hybrid films. **J. Sol-Gel Sci. Technol.**, v. 63, n. 2, p. 211-218, 2012.
31. MATOS, J. D. R.; MACHADO, L. D. B. Análise térmica - Termogravimetria. In: CANEVAROLO JR, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber, 2003. p. 212-215.
32. THOMPSON, M. CHNS Elemental Analysers - AMC Technical Briefs. **The Royal Society of Chemistry**, 2008.
33. NASCENTE, P. A. P. Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X. In: CANEVAROLO JR, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber.
34. SHARD, A. G. Detection limits in XPS for more than 6000 binary systems using Al and Mg K α X-rays. **Surf. Interface Anal.**, v. 46, p. 175-185, 2014.
35. SHAO, W. et al. Novel bioactive surface functionalization of bacterial cellulose membrane. **Carb. Pol.**, v. 178, p. 273-274, 2017.
36. FRONE, A. N. et al. Surface Treatment of Bacterial Cellulose in Mild, Eco-Friendly Conditions. **Coatings**, v. 8, n. 221, p. 3-17, 2018.
37. GONÇALVES, M. D. C. Microscopia eletrônica de transmissão. In: CANEVAROLO JR, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. Artliber, 2003. p. 165-167.
38. CORREA, C. A. Microscopia eletrônica de transmissão. In: CANEVAROLO JR, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber, 2003. p.

177-179.

39. ROBLES, E.; CSÓKA, L.; LABIDI, J. Effect of Reaction Conditions on the Surface Modification of Cellulose Nanofibrils with Aminopropyl Triethoxysilane. **Coatings**, v. 8, n. 4, p. 139, 2018.
40. ZISMAN, W. A. Chapter 1, Relation of the Equilibrium Contact Angle to Liquid and Solid Constitution. In: **Contact Angle, Wettability, and Adhesion**. Advances in Chemistry, v. 43, 1964. p. 1-51.
41. FOWKES, F. M.. Attractive forces at interfaces. **Ind. Eng. Chem.**, v. 56, n. 12, p. 40-52, 1964.
42. WU, S. Calculation of Interfacial Tension in Polymer Systems. **J. Pol. Sci. C: Pol. Symp.**, v. 34, n. 1, p. 19-30, 1971.
43. FENG, X. J.; JIANG, L. Design and Creation of Superwetting/Antiwetting Surfaces. **Adv. Mater.**, v. 18, n. 23, p. 3063-3078, 2006.
44. GENTLEMAN, M. M.; GENTLEMAN, E. The role of surface free energy in osteoblast– biomaterial interactions. **Int. Mater. Rev.**, v. 59, n. 8, p. 417-429, 2014.
45. LERMAN, M. J. et al. The Evolution of Polystyrene as a Cell Culture Material. **Tissue Eng. Part B Rev.**, v. 24, n. 5, p. 359–372, 2018.
46. SVENSSON, A. et al. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomater.**, v. 26, n. 4, p. 419-431, 2005.
47. CZAJA, W. et al. Microbial cellulose-the natural power to heal wounds. **Biomater.**, v. 27, n. 2, p. 145-151, 2006.
48. SANCHAVANAKIT, N. et al. Growth of Human Keratinocytes and Fibroblasts on Bacterial Cellulose Film. **Biotechnol. Prog.**, v. 22, p. 1194–1199, 2006.
49. THANH, N. T. K.; ROSENWEIG, Z. Development of an aggregation-based immunoassay for anti- protein A using gold nanoparticles. **Anal. Chem.**, v. 74, n. 7, p. 1624–1628, 2002.
50. OTSUKA, H. et al. Quantitative and reversible lectin-induced association of gold nanoparticles modified with alpha-lactosyl-omega-mercapto-poly(ethylene glycol). **J. Am. Chem. Soc.**, v. 123, n. 34, p. 8226–8230, 2001.
51. REYNOLDS, R. A.; MIRKIN, C. A.; LETSINGER, R. Homogeneous, nanoparticle-

- based quantitative colorimetric detection of oligonucleotides. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 122, p. 795–3796, 2000.
52. KESARKAR, R. et al. Simplistic Approach Towards Synthesis of Highly Stable and Biocompatible L-Cysteine Capped Gold Nanosphere Intermediate for Drug Conjugation. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 31, n. 1, p. 143-146, 2015.
53. BROLO, A. G. Plasmonics for future biosensors. **Nat. Photonics**, v. 6, p. 709-713, 2012.
54. ACRES, R. G. et al. Mechanisms of Aggregation of Cysteine Functionalized Gold Nanoparticles. **J. Phys. Chem. C**, v. 118, n. 19, p. 10481-10487, 2014.
55. RAJ, V.; VIJAYAN, A. N.; JOSEPH, K. Cysteine capped gold nanoparticles for naked eye detection of E. coli bacteria in UTI patients. **Sens. Bio-Sensing Res.**, v. 5, p. 33-36, 2015.
56. CHEN, M. et al. Bacterial Cellulose Supported Gold Nanoparticles with Excellent Catalytic Properties. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 7, n. 39, p. 21717–21726, 2015.
57. ZHANG, T. et al. Biotemplated Synthesis of Gold Nanoparticle–Bacteria Cellulose Nanofiber Nanocomposites and Their Application in Biosensing. **Adv. Funct. Mater.**, v. 20, n. 7, p. 1152–1160, 2010.
58. MORALES-NARVÁEZ, E. et al. Nanopaper as an Optical Sensing Platform. **ACS Nano**, v. 9, n. 7, p. 7296-7305, 2015.
59. TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discuss. Faraday. Soc.**, v. 11, p. 55–75, 1951.
60. HAISS, W. et al. Detection of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. **Anal. Chem.**, v. 79, n. 11, p. 4215-4221, 2007.
61. WANG, W. et al. Zeta-potential data reliability of gold nanoparticle biomolecular conjugates and its application in sensitive quantification of surface absorbed protein. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, v. 148, p. 541–548, 2016.
62. PIRES, P. A. R. Espalhamento de luz. In: CANEVAROLO JR, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber, 2003.
63. PETEAN, I. et al. Cysteine mediated assembly of gold nanoparticles. **J.**

Optoelec. Adv. Mater. , v. 10, n. 9, p. 2289-2292, 2008.

64. NAZ, et al. Biokinetics of ultrafine gold nanoparticles (AuNPs) relating to redistribution and urinary excretion: a long-term in vivo study. **J. Drug Targeting** , v. 24, n. 8, p. 720–729, 2016.
65. LIEBIG, F. et al. A new route to gold nanoflowers. **Nanotech.**, v. 29, n. 18, p. 185603, 2018.
66. HAWKES, R.; NIDAY, E.; GORDON, J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. **Anal. Biochem.**, v. 119, p. 142-147, 1982.