



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MARIA JOSÉ MAGALHÃES CARNEIRO**

**NANOPARTÍCULAS TERMOSENSÍVEIS DE SULFATO DE CELULOSE  
BACTERIANA ENXERTADO COM N-ISOPROPILACRILAMIDA**

**FORTALEZA**

**2018**

MARIA JOSÉ MAGALHÃES CARNEIRO

NANOPARTÍCULAS TERMOSENSÍVEIS DE SULFATO DE CELULOSE  
BACTERIANA ENXERTADA COM N-ISOPROPILACRILAMIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre Química. Área de concentração: Química.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula.

Co-orientadora: Dra. Morsyleide de Freitas Rosa.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C289n Carneiro, Maria José Magalhães.

Nanopartículas termossensíveis de sulfato de celulose bacteriana enxertado com N-isopropilacrilamida /  
Maria José Magalhães Carneiro. – 2018.  
77 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação  
em Química, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula.

Coorientação: Profa. Dra. Morsyleide de Freitas Rosa.

1. Sulfato de celulose bacteriana. 2. N-isopropilacrilamida. 3. Nanopartículas. I. Título.

CDD 540

---

MARIA JOSÉ MAGALHÃES CARNEIRO

NANOPARTÍCULAS TERMOSENSÍVEIS DE SULFATO DE CELULOSE  
BACTERIANA ENXERTADA COM N-ISOPROPILACRILAMIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula. (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Francisco Audísio Dias Filho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais e familiares.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo privilégio da vida e por ter me dado a oportunidade de trilhar um caminho com muitas conquistas e aprendizados.

Aos meus pais pelo incentivo e esforço para que eu pudesse chegar até aqui. Por estarem sempre presentes nos momentos de conquistas e perdas, dando conselhos, força e suporte.

Ao meu amor, Rafael Rodrigues, que tenho muito a agradecer por estar sempre ao meu lado, disponível para me ajudar. Obrigada pelos conselhos, incentivos e pela força que me fizeram alcançar muitos objetivos.

À professora Dra. Regina Célia Monteiro de Paula pela orientação, pelos incentivos e por ter me dado suporte para finalizar este trabalho. E à Dra. Morsyleide de Freitas Rosa pela coorientação e por estar sempre disponível para ajudar. Tenho muito a agradecê-las.

A toda equipe do Laboratório de Polímeros (LabPol) pelo companheirismo e pela disponibilidade. Pelos momentos de descontração e pelo apoio nos momentos triste e feliz. Vocês são minha segunda família! Muito obrigada, professoras Regina, Judith, Pablyana e Jeanny, Rayane, Natália, Venícios, Marquinhos, Airton, Wesley, Kayena, Laís, Everton, Williane, Carlos, Rodrigo, Fabrício, Ana Rosa, Fernanda, Mayrla, Rudson, Nádia, Tereza, Irisvan, Rhamon, Carol, Samile e Felipe.

Um agradecimento especial à Laís e ao Airton por terem me ajudado bastante na realização deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Tecnologia da Biomassa (LTB) pela receptividade, atenção e disponibilidade.

A todo o corpo docente da Química pela dedicação e esforço para transmitir o conhecimento aos alunos.

A todos os meus amigos que me ajudaram de forma direta e indireta. Sempre dando apoio, com palavras de incentivo e conselhos para vida acadêmica e pessoal.

Ao CENAUREMN pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Laboratório de Raios-X da UFC pelas análises realizadas.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial ao Programa de Pós-graduação em Química.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Em seu coração o homem planeja o seu caminho, mas o Senhor determina os seus passos.

Provérbios 16:9



## RESUMO

Nanopartículas de copolímeros anfífilos à base de polissacarídeos e seus derivados têm sido amplamente estudadas por apresentarem características como biocompatibilidade e biodegradabilidade, o que as tornam materiais promissores para aplicações biomédicas. Diante disto, este trabalho tem como objetivo sintetizar e caracterizar nanopartículas termosensíveis à base de sulfato de celulose bacteriana enxertada com poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAM). A celulose bacteriana (CB) foi modificada quimicamente através da reação de sulfatação, utilizando complexo de ácido clorossulfônico e N,N-dimetilformamida (HSO<sub>3</sub>Cl/DMF) em DMF. Foram sintetizados dois derivados com diferentes graus de sulfatação e estes foram caracterizados por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C (RMN <sup>13</sup>C), difração de raios X (DRX) e cromatografia de permeação em gel (GPC). O grau de sulfatação (GS) foi determinado por análise elementar e os derivados SCB 1,2 e SCB 2 apresentaram GS de 0,8 e 1,56, respectivamente. Através das técnicas de FTIR e RMN foi possível confirmar a reação de sulfatação da celulose e por DRX observou-se que a reação de sulfatação ocasionou a amorfização dos derivados. Os copolímeros foram sintetizados por polimerização radicalar. A influência do tipo de iniciador químico, da temperatura, da quantidade de iniciador e de NIPAM foi estudada. Foram utilizados como iniciadores químicos o persulfato de potássio (KPS) e o nitrato de amônio cérico IV (CAN) e os produtos obtidos foram caracterizados por FTIR, RMN <sup>1</sup>H, concentração de associação crítica (CAC) e espalhamento de luz dinâmico (DLS). O grau de inserção das cadeias de PNIPAM na síntese com KPS foi menor que na síntese utilizando CAN. Ao variar a temperatura das sínteses (temperatura ambiente e 60 °C) observou-se que este fator influenciou na efetividade da enxertia, pois apenas em reações realizadas a 60°C houve o aparecimento de bandas na região do infravermelho referentes ao PNIPAM. Os copolímeros sintetizados com o iniciador KPS apresentaram um aumento de tamanho das partículas com o aumento da temperatura, com uma elevada temperatura crítica (LCST) (46 °C). Enquanto que os copolímeros obtidos com CAN mostraram uma diminuição de tamanho com o aquecimento e um menor LCST (33-34 °C), comportamento característico de copolímeros com maior percentual de enxertia. Além disso, a CAC acima da LCST mostrou-se dependente do percentual de PNIPAM nos copolímeros. Portanto, foi possível sintetizar copolímeros de sulfato de celulose bacteriana enxertado com PNIPAM com propriedades termosensíveis, que levaram à formação de nanopartículas auto-organizadas.

**Palavras-chave:** Sulfato de celulose bacteriana. N-isopropilacrilamida. Nanopartículas.

## ABSTRACT

Amphiphilic copolymer nanoparticles based on polysaccharides and its derivatives have been widely studied due to its features like biocompatibility and biodegradability, which make them promising for biomedical application. In this line, this work intends to synthesize and characterize thermoresponsible nanoparticles based on bacterial cellulose sulfate grafted with poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAM). Bacterial cellulose (BC) was chemically modified through sulfatation reaction by using the complex made of chlorosulfonic acid and N,N – dimethylformamide (HSO<sub>3</sub>Cl/DMF) in DMF. Two derivatives were synthesized with different degrees of sulfatation. They were characterized by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), <sup>13</sup>C magnetic nuclear resonance (<sup>13</sup>C NMR), X-ray diffraction (XRD) and gel permeation chromatography (GPC). Sulfation degree (GS) was determined by elementary analysis. The SCB 1,2 and SCB 2 derivatives presented GS of 0.8 and 1.56, respectively. FTIR and RMN confirmed the sulfation reaction on cellulose and DRX analysis shows that sulfate cellulose derivatives are amorphous. The copolymers were synthesized by radical polymerization. The influences of the type of chemical initiator, temperature, initiator quantity, and NIPAM quantity were studied. The employed chemical initiators were potassium persulfate (KPS) and cerium (IV) ammonium nitrate (CAN) and the products obtained were characterized by FTIR, NMR, critical association concentration (CAC) and dynamic light scattering (DLS). The insertion of PNIPAM chain sulfate cellulose using KPS as initiator was lower than when CAN was used. The change in temperature of synthesis (room temperature and 60 °C) influenced the grafting effectiveness because only the reactions that took place at 60 °C presented bands on infrared characteristics of functional groups PNIPAM. The copolymers synthesized with the initiator KPS presented an increase of particle size as temperature increases and a high lower critical solution temperature (LCST) (46 °C), while copolymers obtained with CAN showed a decrease of size upon heating and lower LCST (33-34 °C), which is characteristic of copolymers containing higher grafting content. In addition, the CAC above the LCST was shown to be dependent on the percentage of PNIPAM in the copolymers. Therefore, it was possible to synthesize copolymers of bacterial cellulose sulfate grafted with PNIPAM with thermoresponsible properties, which led to formation of self-assembled nanoparticles.

**Keywords:** Bacterial cellulose sulfate. N-isopropylacrylamide. Nanoparticles.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura generalizada de alguns tipos de copolímeros .....	17
Figura 2	– Esquema geral das etapas da polimerização radicalar de um monômero vinílico (M) em um polissacarídeo (P), iniciada pela espécie I .....	18
Figura 3	– Enxertia de um monômero vinílico (M) na celulose utilizando iniciador CAN .....	19
Figura 4	– Representação da formação das nanopartículas .....	20
Figura 5	– Fórmula estrutural (a) do monômero vinílico NIPAM e (b) do seu polímero PNIPAM .....	22
Figura 6	– Estrutura das cadeias lineares de celulose, com destaque da unidade fundamental D-glicose (n é igual ao número de unidade de D-glicose) .....	25
Figura 7	– Representação da formação da celulose bacteriana .....	26
Figura 8	– Estrutura do sulfato de celulose .....	27
Figura 9	– Mecanismo da reação de sulfatação da celulose .....	28
Figura 10	– Esquema da preparação da suspensão de CB e do complexo DMF/ HSO <sub>3</sub> Cl .....	31
Figura 11	– Esquema da reação de sulfatação .....	32
Figura 12	– Esquema da reação de enxertia utilizando o iniciador KPS .....	33
Figura 13	– Esquema da reação de enxertia utilizando o iniciador CAN .....	34
Figura 14	– Espectros na região do infravermelho para a CB e as amostras de SCB .....	44
Figura 15	– Espectros de RMN <sup>13</sup> C para os derivados: (a) SCB 2 (b) SCB 1,2 .....	46
Figura 16	– Difractogramas da CB e dos derivados sulfatados SCB 1,2 e SCB 1,2 .....	47
Figura 17	– Cromatogramas dos sulfatos de celulose bacteriana sintetizados .....	48
Figura 18	– Espectros na região do infravermelho dos copolímeros sintetizados utilizando o iniciador KPS e do homopolímero .....	50

Figura 19 – Espectros dos copolímeros (a) KPS5NIPAM46 (2), (b) KPS5NIPAM46 (1) e (c) KPS5NIPAM46TA (1), com ampliações das regiões 3100 – 2800 cm <sup>-1</sup> e 1600 – 1490 cm <sup>-1</sup> .....	50
Figura 20 – Relação do tamanho de partícula com a temperatura para os copolímeros sintetizados utilizando o iniciador KPS .....	51
Figura 21 – Espectros na região do infravermelho dos copolímeros sintetizados utilizando o iniciador CAN e do homopolímero .....	54
Figura 22 – Espectros dos copolímeros (a) CAN24NIPAM46 (1), (b) CAN24NIPAM46TA (2), (c) CAN24NIPAM100 (2), (d) CAN24NIPAM46 (2), (e) CAN10NIPAM46 (2) e (f) CAN5NIPAM46 (2), com ampliações das regiões 3100 – 2800 cm <sup>-1</sup> e 1600 – 1490 cm <sup>-1</sup> .....	55
Figura 23 – Espectros de RMN <sup>1</sup> H dos copolímeros CAN24NIPAM46 (2) e CAN24NIPAM100(2) a 25°C .....	57
Figura 24 – Espectros de RMN <sup>1</sup> H para o derivado sulfatado SCB2 .....	57
Figura 25 – Razões I <sub>338</sub> /I <sub>334</sub> em função das concentrações do copolímero CAN24NIPAM46 (2) a 25 e 50 °C .....	59
Figura 26 – Razões I <sub>338</sub> /I <sub>334</sub> em função das concentrações do copolímero CAN24NIPAM100 (2) a 25 e 50 °C .....	59
Figura 27 – Relação do tamanho de partícula com a temperatura para os copolímeros CAN24NIPAM46 (2), CAN24NIPAM100 (2) e CAN24NIPAM46 (1) .....	61
Figura 28 – Ciclos de aquecimento e resfriamento (25 e 50 °C) dos copolímeros .....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados referentes à síntese, LCST e tamanhos de partículas de copolímeros de polissacarídeos com PNIPAM.....	23
Tabela 2	Condições reacionais da síntese do sulfato de celulose bacteriana.....	32
Tabela 3	Condições reacionais das sínteses dos copolímeros sintetizados com KPS.....	33
Tabela 4	Condições reacionais das sínteses dos copolímeros sintetizados com CAN.....	35
Tabela 5	Teores de enxofre e carbono presentes nos derivados sulfatados e valores de grau de sulfatação.....	39
Tabela 6	Valores das razões molares $\text{HSO}_3\text{Cl}/\text{CB}$ utilizadas nas reações de sulfatação, das massas obtidas de SCB e dos rendimentos.....	40
Tabela 7	Resultados obtidos por diferentes métodos de sulfatação de celulose bacteriana e vegetal.....	42
Tabela 8	Resultados obtidos por diferentes métodos de sulfatação de polissacarídeos.....	43
Tabela 9	Razão entre as áreas das bandas $1546$ e $1048\text{ cm}^{-1}$ para os copolímeros sintetizados a $60^\circ\text{C}$ com o iniciador KPS.....	51
Tabela 10	Valores dos tamanhos e IPD para os copolímeros, a $25$ e $50^\circ\text{C}$ .....	52
Tabela 11	Razão entre as áreas das bandas $1546$ e $1048\text{ cm}^{-1}$ para os copolímeros sintetizados a $60^\circ\text{C}$ com o iniciador CAN.....	55
Tabela 12	Valores de concentração de associação crítica para os copolímeros CAN24NIPAM46 (2) e CAN24NIPAM100 (2).....	60
Tabela 13	Valores dos tamanhos e IPD para os copolímeros, a $25$ e $50^\circ\text{C}$ .....	62

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	OBJETIVOS .....	16
2.1	Objetivo geral .....	16
2.2	Objetivos específicos .....	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
3.1	Copolímeros por enxertia à base de polissacarídeos .....	17
3.1.1	<i>Polimerização via radicais livres</i> .....	18
3.1.2	<i>Copolímeros anfifílicos por enxertia</i> .....	20
3.2	Poli (N-isopropilacrilamida) .....	21
3.3	Celulose .....	24
3.3.1	<i>Celulose bacteriana (CB)</i> .....	25
3.3.2	<i>Sulfato de celulose bacteriana (SCB)</i> .....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
4.1	Reagentes .....	30
4.2	Produção de Celulose Bacteriana .....	30
4.2.1	<i>Microorganismo, inóculo e condições de cultivo</i> .....	30
4.2.2	<i>Purificação das películas de Celulose Bacteriana</i> .....	30
4.2.3	<i>Desconstrução física das películas</i> .....	31
4.3	Síntese do sulfato de celulose bacteriana (SCB) .....	31
4.4	Síntese dos copolímeros de SCB enxertados com PNIPAM .....	33
4.4.1	<i>Síntese dos copolímeros utilizando KPS</i> .....	33
4.4.2	<i>Síntese dos copolímeros utilizando CAN</i> .....	34
4.4.3	<i>Rendimento da reação de enxertia (RE%)</i> .....	36
4.5	Preparação das nanopartículas .....	36
4.6	Caracterizações .....	36
4.6.1	<i>Análise Elementar (AE)</i> .....	36
4.6.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	36
4.6.3	<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i> .....	36
4.6.4	<i>Difração de Raios-X (DRX)</i> .....	37
4.6.5	<i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)</i> .....	37
4.6.6	<i>Concentração de associação crítica (CAC)</i> .....	37

4.6.7	<i>Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)</i> .....	37
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	39
5.1	<b>Síntese, rendimento e grau de sulfatação dos derivados sulfatados</b> .....	39
5.2	<b>Caracterizações da celulose bacteriana e do sulfato de celulose bacteriana</b> .....	44
5.2.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	44
5.2.2	<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i> .....	45
5.2.3	<i>Difração de Raios-X</i> .....	46
5.2.4	<i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)</i> .....	47
5.3	<b>Síntese e caracterização dos copolímeros utilizando o iniciador persulfato de potássio (KPS)</b> .....	48
5.3.1	<i>Síntese dos copolímeros</i> .....	48
5.3.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	49
5.3.3	<i>Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)</i> .....	51
5.4	<b>Síntese e caracterização dos copolímeros utilizando o iniciador nitrato de amônio cérico IV (CAN)</b> .....	53
5.4.1	<i>Síntese dos copolímeros</i> .....	53
5.4.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	53
5.4.3	<i>Ressonância Magnética Nuclear de próton (RMN <sup>1</sup>H)</i> .....	56
5.4.4	<i>Concentração de associação crítica (CAC)</i> .....	58
5.4.5	<i>Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)</i> .....	60
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	64
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, nanopartículas auto-organizadas de copolímeros anfifílicos à base de polissacarídeos e seus derivados têm sido investigadas por apresentarem propriedades promissoras, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, diante de materiais sintéticos (KALIA; SABAA, 2013; de PAULA, *et al.*, 2015).

Estes copolímeros anfifílicos podem ser preparados através da enxertia de cadeias laterais hidrofóbicas por polimerização de um monômero ou pela ligação de um polímero pré-formado. No processo de polimerização ocorre a formação de radicais livres que podem ser gerados por várias técnicas, dentre elas estão química, fotoquímica e por radiação (BHATTACHARYA; MISRA, 2004; BAYRAMGIL, 2015). Entre os métodos químicos, a enxertia com iniciadores redox (nitrato de amônio cérico IV (CAN), persulfato de sódio (KPS), entre outros) oferece vantagens, pois, a reação ocorre sob condições brandas, com um mínimo de reações colaterais (ODIAN, 2004).

Diversos polímeros têm sido utilizados para comporem as cadeias laterais dos copolímeros anfifílicos. Dentre eles se destacam os polímeros inteligentes que alteram sua estrutura e propriedades em resposta a estímulos externos, como temperatura, pH, força iônica e luz. O poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) é um polímero inteligente com propriedades sensíveis a variação de temperatura. Este tem sido bastante estudado no campo biomédico, principalmente por apresentar uma transição de fase próxima à temperatura do corpo humano (32 °C) (SCHILD, 1992; ZHANG, *et al.*, 2015). Através da copolimerização deste com monômeros ou segmentos com caráter hidrofílicos ou hidrofóbicos, a sua temperatura de transição pode ser modulada para adequar-se com a aplicação desejada (HOFFMAN *et al.*, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2012).

A enxertia de PNIPAM tem sido realizada em vários polissacarídeos e seus derivados, como celulose (KASGOZ *et al.*, 2013), carboximetilcelulose (MARQUES *et al.*, 2016), goma do cajueiro (ABREU *et al.*, 2016), quitosana (LAI; LUO, 2017), carragenana (MOHANAN *et al.*, 2011; GAWEL *et al.*, 2013), ulvana (MORELLI *et al.*, 2016) e sulfato de condroitina (VARGHESE *et al.*, 2008; WILTSEY *et al.*, 2013), não tendo sido relatada na literatura a enxertia em sulfato de celulose, foco deste trabalho.

A celulose é o biopolímero mais abundante na natureza, e pode ser produzida por plantas, bactérias, entre outros. A celulose bacteriana (CB) por possuir características como alto grau de polimerização, elevada pureza, fibras com dimensão nanométrica, elevada cristalinidade e alta resistência mecânica tem se tornado um material de interesse em diversos



campos de pesquisa, como biomédico, farmacêutico, alimentício, entre outros (SULAEVA *et al.*, 2015; ULLAH *et al.*, 2017; AZEREDO *et al.*, 2017), mas devido a sua insolubilidade na maioria dos solventes a síntese de diversos derivados celulósicos (como por carboximetilação, acetilação, sulfatação, entre outros) tem sido realizada principalmente na busca de produtos solúveis em água (SCHLUFTER; HEINZE, 2010; IFUKUV, *et al.*, 2007; ZHU, *et al.*, 2014).

O sulfato de celulose bacteriana (SCB) é um derivado celulósico solúvel em água e pode ser obtido a partir da sulfatação da celulose bacteriana, em meio heterogêneo, quase homogêneo ou homogêneo. Por apresentar características como biodegradabilidade, biocompatibilidade e por exibir efeitos biológicos como anticoagulante e antimicrobiano este derivado tem sido estudado na área biomédica e farmacêutica (ZHANG *et al.*, 2015).

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo estudar a enxertia de N-isopropilacrilamida em sulfato de celulose bacteriana a fim de se obter nanopartículas auto-organizadas e termossensíveis.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Preparar e caracterizar nanopartículas termossensíveis à base de sulfato de celulose bacteriana enxertada com poli (N-isopropilacrilamida).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Sintetizar derivados sulfatados com dois graus de sulfatação a partir da celulose bacteriana;
- Caracterizar o sulfato de celulose por análise elementar, FTIR, DRX, GPC e RMN;
- Determinar o efeito do tipo de iniciador, da temperatura, da quantidade de iniciador e de monômero na síntese de sulfato de celulose bacteriana enxertado com poli (N-isopropilacrilamida);
- Caracterizar os copolímeros por FTIR, RMN, CAC;
- Preparar nanopartículas por auto-organização;
- Caracterizar as nanopartículas por DLS.

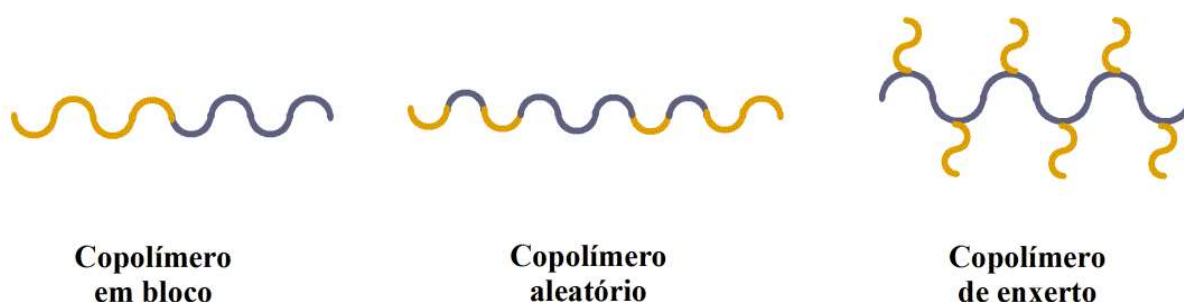
### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Copolímeros por enxertia à base de polissacarídeos

Visando a obtenção de materiais com novas propriedades e uma ampla aplicação, a síntese de copolímeros tem sido realizada há vários anos. Copolímeros são compostos constituídos por diferentes unidades de repetição e o processo em que são sintetizados denomina-se copolimerização. Os polímeros que contêm apenas uma unidade de repetição são chamados de homopolímeros (ODIAN, 2004).

A classificação dos copolímeros é realizada de acordo com o arranjo dos monômeros na cadeia. Na Figura 1, estão mostrados alguns exemplos.

Figura 1 - Estrutura generalizada de alguns tipos de copolímeros



Fonte: Elaborado pela autora.

Os copolímeros em bloco são formados por uma sequência de monômeros ligados covalentemente a uma sequência de outros monômeros. Copolímeros aleatórios ou randômicos possuem os monômeros ligados covalentemente numa distribuição irregular. Já os copolímeros por enxertia são constituídos por uma cadeia principal de um polímero e cadeias laterais de outro polímero, unidos por ligação covalente (ODIAN, 2004).

Vários copolímeros por enxertia têm sido sintetizados, no entanto aqueles que têm em sua composição polímeros naturais se destacam por adquirirem propriedades interessantes para aplicações biomédicas, como carreadores de fármacos. Polissacarídeos e seus derivados são materiais promissores neste campo por serem biocompatíveis e biodegradáveis e no geral compõem a cadeia principal dos copolímeros (KALIA; SABAA, 2013; MAHANTA *et al.*, 2015; de PAULA, *et al.*, 2015).

Uma variada quantidade de monômeros pode ser utilizada para compor as cadeias laterais dos copolímeros por enxertia, como: ácido lático (MAHARANA *et al.*, 2015), N-isopropilacrilamida (CHUMACHENKO *et al.*, 2017), estireno (KEKEZ *et al.*, 2016).

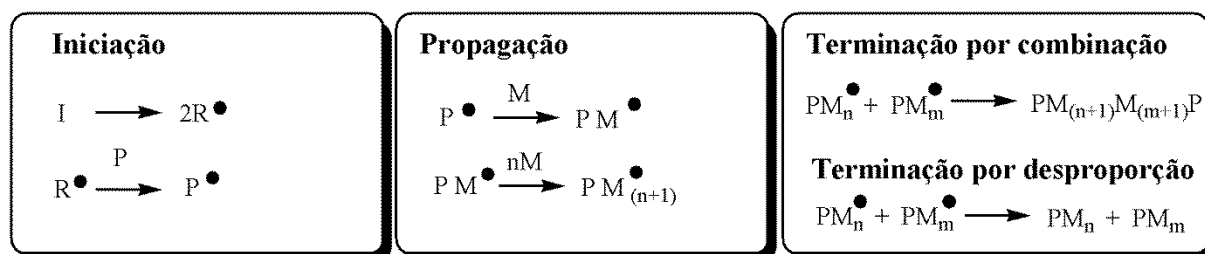
A reação de enxertia pode ser realizada por copolimerização através de três principais estratégias: *grafting through*, *grafting to* e *grafting from*. Na *grafting through* o polissacarídeo pré-funcionalizado com grupo vinila é copolimerizado com um monômero vinílico de baixa massa molar (monômeros vinílicos são pequenas moléculas com duplas ligações entre carbonos). Na *grafting to* uma cadeia polimérica com grupo terminal interage com os grupos funcionais da cadeia principal do polissacarídeo. Já na *grafting from* o crescimento da cadeia lateral ocorre a partir de sítios ativos criados na cadeia principal do polissacarídeo (MOAD; SOLOMON, 2006; PARIDA *et al.*, 2015).

A enxertia de monômeros vinílicos em polissacarídeos através da estratégia *grafting from* tem sido bastante relatada na literatura. E as reações são realizadas principalmente por polimerização via radicais livres (DENG *et al.*, 2015; KEKEZ *et al.*, 2016; CHUMACHENKO *et al.*, 2017).

### 3.1.1 Polimerização via radicais livres

A polimerização via radicais livres ocorre em três etapas gerais: iniciação, propagação e terminação (Figura 2). Na etapa de iniciação, radicais livres são gerados na presença do polissacarídeo levando à formação de espécies ativas. Na propagação, o centro ativo é transferido de monômero a monômero ocorrendo o crescimento das cadeias laterais. Já na etapa de terminação ocorre a desativação das cadeias em propagação gerando moléculas estáveis. Esta etapa pode ocorrer pela combinação ou desproporção de duas cadeias em crescimento (MOAD; SOLOMON, 2006; PARIDA *et al.*, 2015).

Figura 2 - Esquema geral das etapas da polimerização radicalar de um monômero vinílico (M) em um polissacarídeo (P), iniciada pela espécie I



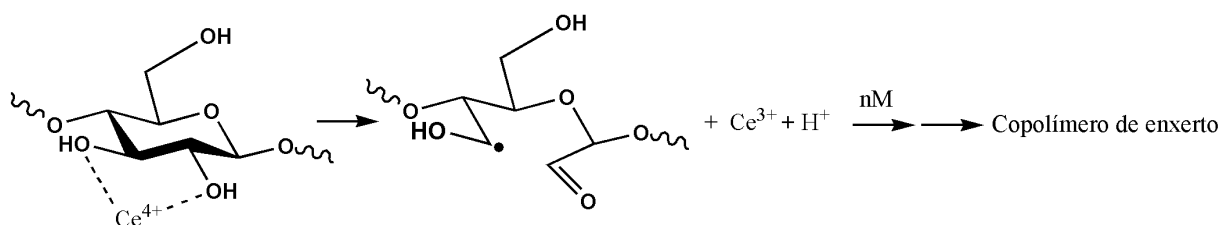
Fonte: Adaptado de Moad; Solomon, 2006.

Dentre as técnicas mais utilizadas para a iniciação da polimerização estão a química, fotoquímica e por radiação (BHATTACHARYA; MISRA, 2004; BAYRAMGIL, 2015).

Na iniciação química são utilizados reagentes redox como íons de metais de transição ( $\text{Ce}^{4+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{V}^{5+}$ ) (CHUMACHENKO *et al.*, 2017; MISHRA *et al.*, 1981; BAJPAI *et al.*, 2004), persulfatos (persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  ou KPS) e persulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  ou APS)) (KEKEZ *et al.*, 2016; UMAR *et al.*, 2016), reagente de Fenton ( $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ) (MAATAR; BOUFI, 2015), permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) (GAWEL *et al.*, 2013). O uso de iniciadores redox em reações de enxertia oferece vantagens, pois as reações podem ser realizadas em condições brandas e as reações de homopolimerização são minimizadas (ODIAN, 2004).

A enxertia de monômeros vinílicos em polissacarídeos utilizando o nitrato de amônio cérico IV (CAN) tem sido estudada por vários pesquisadores (CHUMACHENKO *et al.*, 2017; KALAOĞLU *et al.*, 2016; ABREU *et al.*, 2016; DENG *et al.*, 2015; MUNDARGI *et al.*, 2007). O íon cérico ( $\text{Ce}^{4+}$ ), na presença de ácido nítrico, é capaz de oxidar o anel piranosídico do polissacarídeo e nele produzir radicais livres. Na literatura encontram-se duas propostas para a etapa de iniciação. Em uma das propostas ocorre a abstração direta do átomo de hidrogênio do carbono ligado a grupos nucleofílicos (como hidroxila, amina) (ODIAN, 2004). Na outra proposta, o íon cérico forma um complexo com os grupos nucleofílicos (como hidroxila, amina) presentes nos carbonos C-2 e C-3 das unidades monossacarídicas. Com a abstração do átomo de hidrogênio de um dos grupos nucleofílicos, o complexo é decomposto em próton e íon  $\text{Ce}^{3+}$  e a ligação C-C do anel é quebrada formando um aldeído e um radical livre no carbono C-2 ou C-3 (Figura 3) (ROY *et al.*, 2009).

Figura 3 - Enxertia de um monômero vinílico (M) na celulose utilizando iniciador CAN



Fonte: Adaptado de Roy *et al.*, 2009.

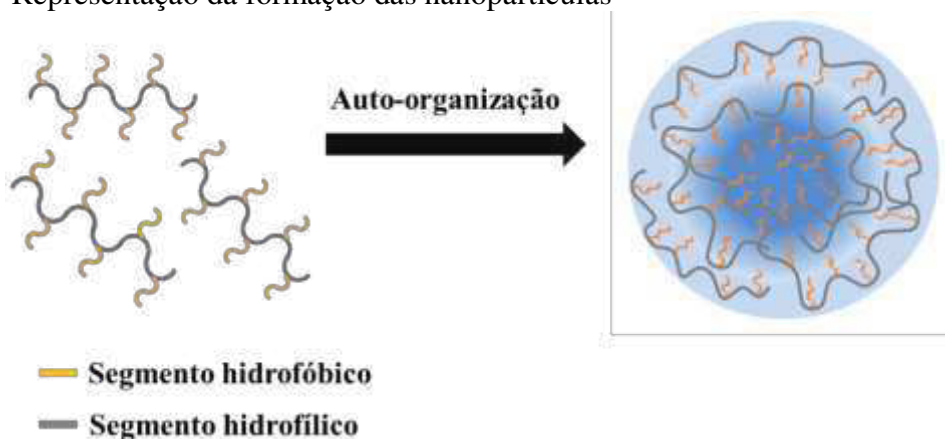
O persulfato de potássio também tem sido utilizado como iniciador em síntese de copolímeros por enxertia à base de polissacarídeos (MARQUES *et al.*, 2016; YILMAZ *et al.*, 2016; EL-HAMSHARY *et al.*, 2015). Assim como para o CAN, a iniciação por meio do KPS também se dá pela geração de radicais livres no polissacarídeo. Em estudos realizados por Liu e Sun (2008), os prováveis locais onde os radicais são gerados na cadeia de celulose são nos carbonos C-3 e C-4 dos anéis glicosídicos.

### 3.1.2 Copolímeros anfífilicos por enxertia

Quando os copolímeros por enxertia são constituídos tanto por segmentos hidrofílicos como hidrofóbicos denominam-se copolímeros anfífilicos. (ALEXANDRIDIS, 1996).

Copolímeros anfífilicos ao serem adicionados em meio aquoso tendem a se auto-organizar em nanopartículas (semelhantes a micelas) com o núcleo hidrofóbico e a camada externa hidrofílica, após a concentração de associação crítica (CAC), mínima concentração necessária para a formação destes (Figura 4). Já quando são expostos a um solvente orgânico tendem a formar uma estrutura inversa (TALELLI *et al.*, 2010; BORDALLO *et al.*, 2015).

Figura 4 - Representação da formação das nanopartículas



Fonte: Adaptado de de Paula *et al.*, 2015.

O processo de auto-organização é espontâneo e dirigido por interações não covalentes, como forças hidrofóbicas, de Van der Waals, ligações de hidrogênio, entre outras e estas desempenham o papel de manter a estabilidade e integridade dos nanopartículas formadas (LIM, 2012).

Nanopartículas são materiais com as três dimensões na escala nanométrica (1-100 nm), porém para aplicações como sistemas de liberação de fármacos são aceitas nanopartículas com tamanhos na faixa de 50 – 500 nm (UCHECHI *et al.*, 2014). O uso destes materiais como veículos transportadores de fármacos tem sido proposto em diversos estudos por estas apresentarem características como alta área superficial e capacidade de adsorver e incorporar fármacos através de interações covalentes ou não-covalentes (JONG, DE; BORM, 2008; ABREU *et al.*, 2016; LUO *et al.*, 2017)

Existem variados métodos de preparo de nanopartículas e estes variam de acordo com as características dos copolímeros anfífilicos. Em uma das técnicas, os copolímeros são

dissolvidos em um solvente específico e a solução é dialisada contra água, onde o solvente é removido. Nesse processo de remoção do solvente os copolímeros se autorganizam em agregados com os segmentos hidrofóbicos na parte central e os segmentos hidrofílicos ficam em contato com a fase aquosa (QIU *et al.*, 2009).

Outra forma de preparo é realizada quando os copolímeros apresentam cadeias laterais constituídas por polímeros inteligentes que em resposta a estímulos externos (como temperatura, pH, força iônica, luz) alteram sua estrutura e propriedades (QIU; HU, 2013; AGUILAR; ROMÁN, 2014). Copolímeros anfifílicos com cadeias laterais constituídas por estes polímeros, ao sofrerem estímulos externos tendem a se auto-estruturarem em micelas com um núcleo hidrofóbico e uma camada externa hidrofílica, em meio aquoso. Sendo assim potenciais carreadores de fármacos hidrofóbicos, pois estes podem interagir com os segmentos hidrofóbicos dos copolímeros que, ao se auto-estruturarem, são capazes de solubilizar e encapsular o fármaco (QIU; HU, 2013; YU *et al.*, 2016).

### 3.2 Poli (N-isopropilacrilamida)

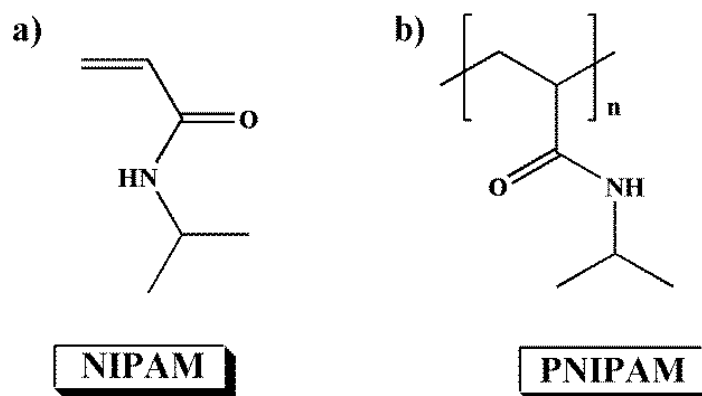
Alguns polímeros como poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAM), poli (ácido láctico), poli (N-vinilcaprolactama) entre outros, apresentam transição de fase dependente da temperatura e são denominados polímeros termossensíveis. A transição de fase neste caso está relacionada com a solubilidade do polímero e a temperatura em que esta ocorre é denominada temperatura crítica (WARD; GEORGIU, 2011; HOOGENBOOM, 2014).

O polímero exibe um comportamento do tipo LCST (*Lower Critical Solution Temperature*) quando a sua solubilidade em água é abaixo da temperatura crítica, ou seja, as ligações de hidrogênio entre o polímero e as moléculas de água predominam, em relação às interações entre as moléculas de polímero. Acima desta temperatura, ocorre o favorecimento das ligações de hidrogênio intermoleculares e das interações entre os segmentos hidrofóbicos do polímero o que leva à expulsão das moléculas de água (desidratação) e à sua hidrofobização. Quando o polímero é solúvel em água acima da temperatura crítica, seu comportamento é do tipo UCST (*Upper Critical Solution Temperature*) (HOOGENBOOM, 2014; CHEN *et al.*, 2015).

Dentre os polímeros termossensíveis mais estudados no campo biomédico, o poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) destaca-se por apresentar LCST próxima à temperatura do corpo humano (em torno de 32 °C) (SCHILD, 1992; WEI *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2015).

O PNIPAM é um polímero sintético com o monômero vinílico, N-isopropilacrilamida (NIPAM), como unidade de repetição. Em sua estrutura encontram-se grupos hidrofílicos (NH e C=O) bem como um grupo hidrofóbico (isopropil) que são responsáveis pela termossensibilidade do polímero (SCHILD, 1992) (Figura 5).

Figura 5 - Fórmula estrutural (a) do monômero vinílico NIPAM e (b) do seu polímero PNIPAM



Fonte: Elaborado pela autora.

A temperatura de transição (LCST) do PNIPAM é controlada pelo equilíbrio entre os seus segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos, podendo esta temperatura ser modulada através da copolimerização de monômeros hidrofílicos ou hidrofóbicos. Quando o NIPAM é copolimerizado com monômeros ou segmentos com caráter hidrofílico, a LCST pode ser aumentada, enquanto quando é copolimerizado com monômeros hidrofóbicos a LCST pode ser reduzida (HOFFMAN *et al.*, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2012).

O PNIPAM tem sido enxertado em vários polissacarídeos como celulose (KASGOZ *et al.*, 2013), carboximetilcelulose (MARQUES *et al.*, 2016), metilcelulose (SÁ-LIMA *et al.*, 2011), alginato (VASILE; NITA, 2011; YU *et al.*, 2016), goma do cajueiro (ABREU *et al.*, 2016), quitosana (LAI; LUO, 2017), dextrana (CHUMACHENKO *et al.*, 2017), pululana (CONSTANTIN *et al.*, 2017).

Dentre os polissacarídeos sulfatados o PNIPAM já foi enxertado em carragenana (MOHANAN *et al.*, 2011; GAWEL *et al.*, 2013), ulvana (MORELLI *et al.*, 2016) e sulfato de condroitina (VARGHESE *et al.*, 2008; WILTSEY *et al.*, 2013), não tendo sido relatado na literatura a enxertia em sulfato de celulose.

A Tabela 1 mostra os valores de LCST e dos diâmetros de partículas para copolímeros de PNIPAM com polissacarídeos.



Tabela 1 - Dados referentes à síntese, LCST e tamanhos de partículas de copolímeros de polissacarídeos com PNIPAM

Polissacarídeo	Iniciador	LCST (°C)	Tamanho das partículas a 25 °C (nm)	Tamanho das partículas a 40 - 50°C (nm)	Referência
Celulose	CAN	32,4	-	-	KASGOZ <i>et al.</i> , 2013
Metilcelulose	APS	32	-	-	SÁ-LIMA <i>et al.</i> , 2011
Alginato	KPS	32,5	-	-	YU <i>et al.</i> , 2016
Alginato <sup>1</sup>	-	35 - 37	550	200	VASILE <i>et al.</i> , 2016
Goma do cajueiro	CAN	35 - 37	12 - 21	113	ABREU <i>et al.</i> , 2016
Quitosana <sup>1</sup>	-	29,5 - 31,9	-	-	LAI; LUO, 2017
Pululana	CAN	34	-	-	CONSTANTIN <i>et al.</i> , 2017
Carragenana	KMnO <sub>4</sub> / H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	34 - 35	12	110	GAWEL <i>et al.</i> , 2013
Ulvana <sup>2</sup>	-	30 - 32	-	-	MORELLI <i>et al.</i> , 2016
Quitosana	CAN	32,8	445	362	LI <i>et al.</i> , 2013
Carboximetil quitosana	APS <sup>3</sup>	36	321-343	91-87	CHEN <i>et al.</i> , 2010

<sup>1</sup>Sintetizado por copolimerização *grafting to*.<sup>2</sup> Copolimerização iniciada por UV.<sup>3</sup>APS: Persulfato de amônio.

O comportamento do tamanho com aumento da temperatura para as nanopartículas de copolímeros de polissacarídeos com PNIPAM pode variar dependendo do grau de enxertia. Vasile e Nita (2011) produziram copolímeros de alginato com PNIPAM e observaram que se o percentual de PNIPAM for baixo existe um aumento de tamanho das partículas com o aumento

da temperatura, com um concomitante aumento da temperatura de transição. Para copolímeros com um percentual maior de PNIPAM, a temperatura de transição diminui e o tamanho das nanopartículas diminui com o aumento da temperatura (VASILE; NITA, 2011).

Copolímeros de Goma do cajueiro e carragenana com PNIPAM apresentam um aumento de diâmetro das nanopartículas com o aumento da temperatura, enquanto os outros polissacarídeos descritos na Tabela 1 apresentam comportamento inverso.

Vários estudos foram realizados a fim de investigar a citotoxicidade do polímero de PNIPAM em diversos tipos de células. Deptuła *et al.*, (2015) mostraram que as nanopartículas de PNIPAM não apresentam toxicidade em células de câncer do colo do útero (Células HELA) e nem em células de rim embrionário humano (Células HeK293) até um concentração de 2mg/mL por 24h. Naha *et al.*, (2010) investigaram a citotoxicidade em células HaCaT (queratinócitos humanos não cancerosos) e SW480 (adenocarcinoma primário de cólon humano) e não observaram toxicidade até 1mg/mL por 96 h. Testes em ratos foram realizados para verificar a toxicidade cumulativa com uma dosagem diária de 2000 mg/kg e não foram reportados efeitos adversos (MALONNE *et al.*, 2015).

Mellati *et al.*, (2016) mostraram que cadeias muito curtas de PNIPAM (30-35 unidades monoméricas) podem apresentar toxicidade. Baixa toxicidade foi observada pelos autores para cadeias com mais de 400 unidades monoméricas, entretanto PNIPAM com cadeias intermediárias (100 -200 unidades monoméricas) são atóxicas (MELLATI *et al.*, 2016).

Copolímeros de PNIPAM com policaprolactona (LEE *et al.*, 2015), ácido acrílico (JANKAEW *et al.*, 2015) e goma do cajueiro (ABREU *et al.* 2016) não apresentaram citotoxicidade em células.

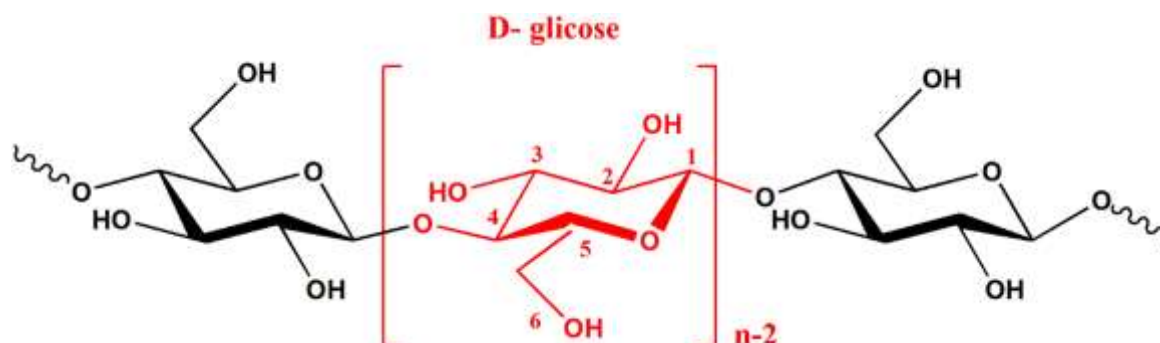
### 3.3 Celulose

Celulose é o polissacarídeo mais abundante em todo o planeta terra, estruturalmente, a macromolécula apresenta uma cadeia linear não ramificada constituída por uma sequência de unidades de D-glicose associadas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), como representado na Figura 6 (O'SULLIVAN, 1997; KLEMM *et al.*, 2005).

Cada uma das unidades glicosídicas (UG) possui três grupos hidroxila (OH) nas posições C-2, C-3 e C-6. Estes grupos hidroxila possibilitam a celulose sofrer reações típicas de álcoois e, além disso, desempenham um papel importante na solubilidade desta. A celulose é insolúvel em água e em grande parte dos solventes orgânicos. Isto acontece devido ao fato de os átomos de oxigênio e hidrogênio estarem envolvidos na formação de ligações de hidrogênio

inter e intramoleculares, que são responsáveis pela formação das fibras celulósicas e pela sua resistência mecânica, respectivamente (KOCHERBITOV *et al.*, 2008; CREDOU; BERTHELOT, 2014).

Figura 6 - Estrutura das cadeias lineares de celulose, com destaque da unidade fundamental D-glicose (n é igual ao número de unidade de D-glicose)



Fonte: Elaborado pela autora.

Geralmente, a celulose apresenta quatro principais polimorfos, que são celulose I (celulose nativa), II, III e IV. A celulose I, tipo disponível na natureza, quando submetida a um processo de regeneração (fibras passam por um processo de dissolução em solvente específico e subsequente precipitação em solução geralmente alcalina) ou mercerização (imersão em solução de hidróxido de sódio) produz a celulose II. A celulose II, sendo constituída de cadeias antiparalelas, raramente pode ser encontrada na natureza. Esta é termodinamicamente mais estável que a nativa, que apresenta cadeias paralelas (KLEMM *et al.*, 2005; SIQUEIRA *et al.*, 2010).

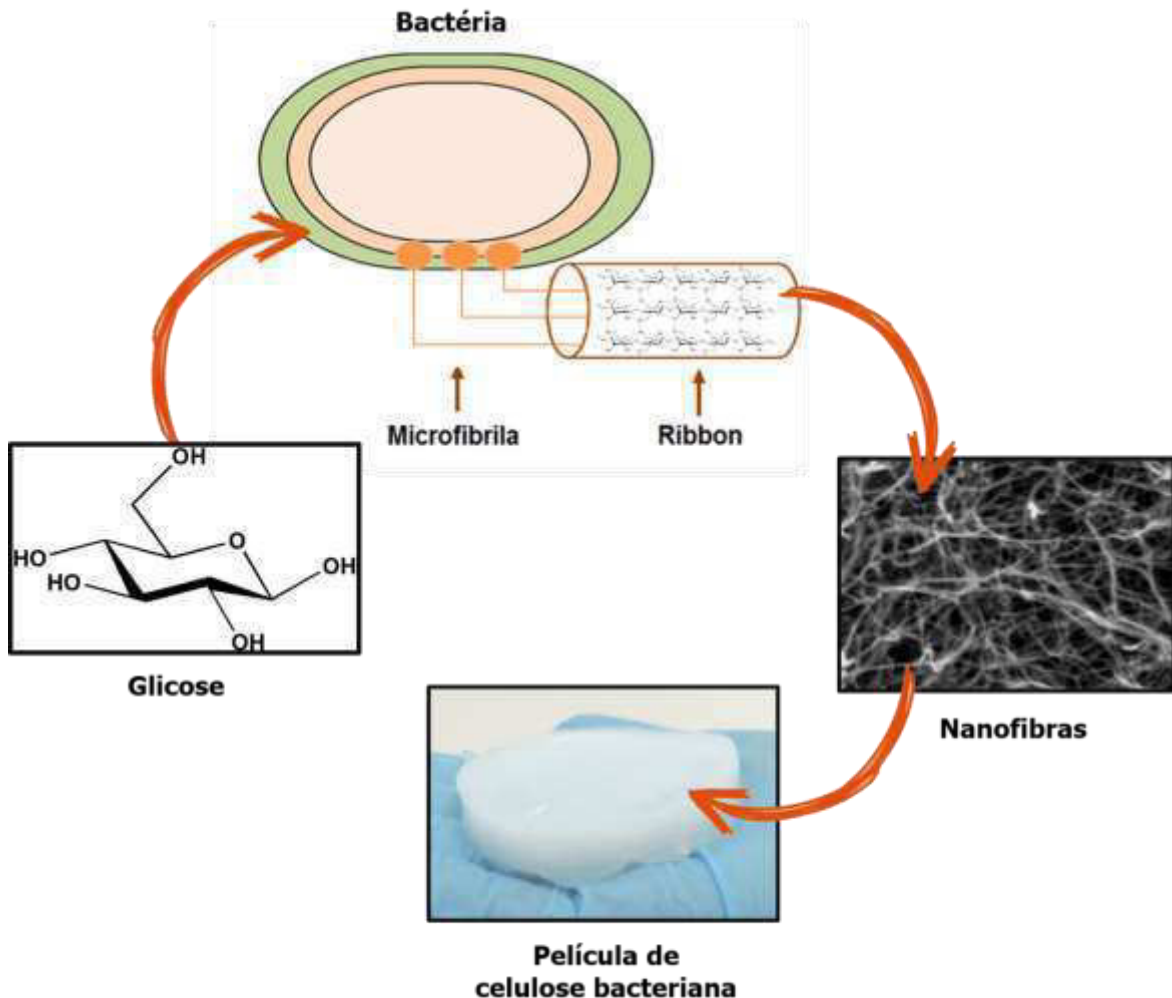
A parede celular das plantas é composta principalmente de celulose, que se encontra ligada fisicamente com lignina e hemicelulose (UMMARTYOTIN; MANUSPIYA, 2014). A celulose não é encontrada apenas nas plantas. Outros seres vivos como algumas espécies de bactérias, fungos e algas também são capazes de produzi-la (MIHRANYAN, 2011; MAEHARA *et al.*, 2013; FANG; CATCHMARK, 2015).

### 3.3.1 Celulose bacteriana (CB)

Dentre os gêneros de bactérias capazes de produzir celulose estão *Komagataeibacter* (anteriormente classificada como *Gluconacetobacter*), *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Salmonella* e *Escherichia* (HUANG *et al.*, 2014).

Durante a síntese da celulose bacteriana as unidades de glicose são polimerizadas em cadeias lineares por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), entre a membrana externa e a membrana citoplasmática. Em seguida, as cadeias lineares são secretadas para fora da célula através dos poros existentes na membrana plasmática e então são agregadas por ligações de hidrogênio formando as nanofibras (ribbons). Portanto, a celulose bacteriana pode ser descrita como um exopolissacarídeo (ROSS *et al.*, 1991; CZAJA *et al.*, 2006). A Figura 7 ilustra a formação da celulose bacteriana.

Figura 7 - Representação da formação da celulose bacteriana



Fonte: Elaborado pela autora.

A celulose sintetizada por bactérias apresenta estrutura semelhante à da celulose vegetal, porém ela possui algumas propriedades bastante singulares. A CB apresenta grau de polimerização (GP) de 2000-6000 enquanto a celulose vegetal possui 13000-14000, apresenta elevada pureza (> 98%, livre de lignina, pectina e hemicelulose), fibras com dimensão nanométrica (70-80 nm) enquanto que as fibras de origem vegetal são micrométricas (1,4 – 4,0

$\times 10^{-2}$  mm e apresenta elevada cristalinidade (65–79%) comparada a celulose vegetal (56–65%) (CHAWLA *et al.*, 2009; SULAIEVA *et al.*, 2015).

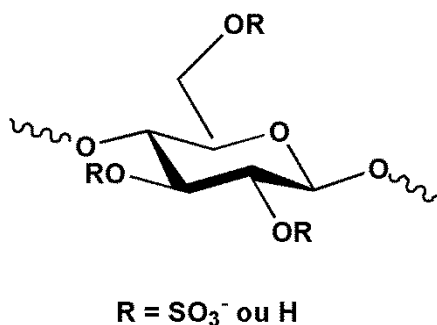
Devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e suas propriedades únicas, a CB possui uma vasta aplicabilidade em diversas áreas, como biomédica, farmacêutica, alimentícia (SULAIEVA *et al.*, 2015; AZEREDO *et al.*, 2017; ULLAH *et al.*, 2017).

A celulose é insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos, visando contornar esta barreira e ampliar seu campo de aplicações, vários derivados de celulose bacteriana e vegetal solúveis em água têm sido sintetizados (carboximetilcelulose, acetato de celulose, sulfato de celulose, entre outros) (IFUKU *et al.*, 2007; SCHLUFTER; HEINZE, 2010; ZHU *et al.*, 2014).

### 3.3.2 Sulfato de celulose bacteriana (SCB)

O sulfato de celulose é um derivado solúvel em água, com uma estrutura simples e com propriedades únicas. A sua síntese é realizada através da reação de sulfatação, onde cada hidrogênio das hidroxilas presente na estrutura da celulose pode ser substituído por um grupo  $\text{SO}_3^-$  como apresentado na Figura 8.

Figura 8 – Estrutura do sulfato de celulose



Fonte: Elaborado pela autora.

A sulfatação da celulose pode ocorrer em meio heterogêneo, quase homogêneo e homogêneo, com a utilização de variados reagentes de sulfatação e solventes. Dentre os reagentes sulfatantes utilizados estão: o ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (YAO, 2000), o ácido clorossulfônico ( $\text{HSO}_3\text{Cl}$ ) (HORIKAWA *et al.*, 2015), o ácido sulfâmico ( $\text{H}_3\text{NSO}_3$ ) (SVENSSON *et al.*, 2005), complexos de  $\text{SO}_3$  (como  $\text{SO}_3/\text{DMF}$  e  $\text{SO}_3/\text{piridina}$ ) (BAUMANN *et al.*, 2000; MUHITDINOV *et al.*, 2017), complexos de  $\text{HSO}_3\text{Cl}$  (como  $\text{HSO}_3\text{Cl}/\text{piridina}$  e  $\text{HSO}_3\text{Cl}/\text{DMF}$ ) (BAUMANN *et al.*, 2000; QIN *et al.*, 2014).

Como a celulose é insolúvel em grande parte dos solventes, os processos de sulfatação, geralmente, são realizados em meio heterogêneo ou quase homogêneo. A sulfatação

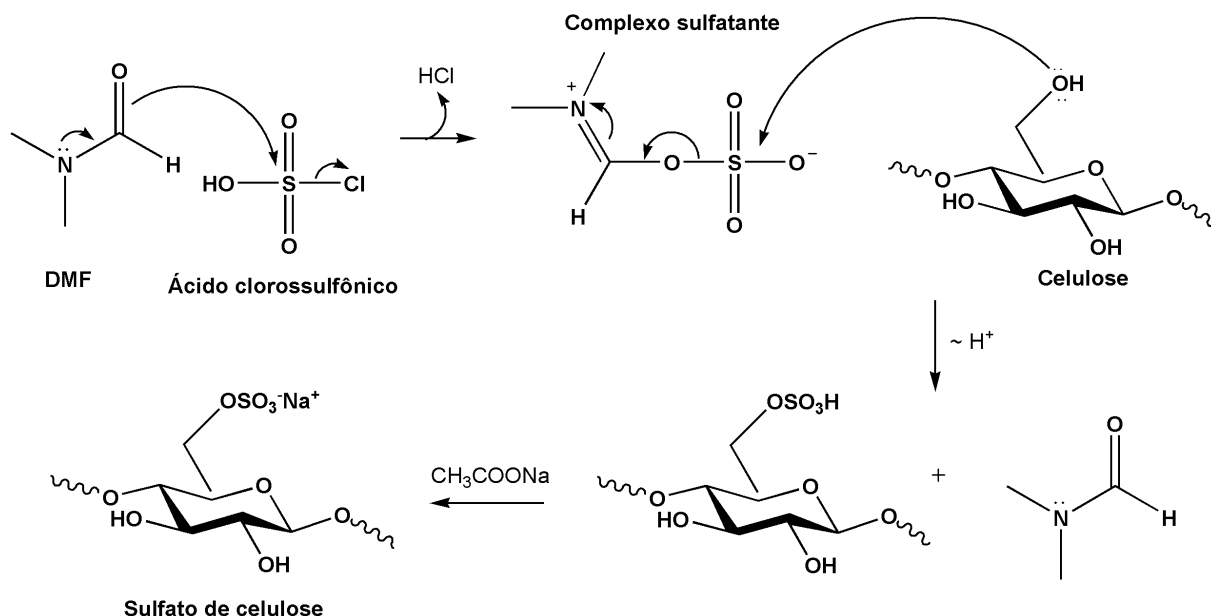
heterogênea pode ser realizada com a utilização de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) em propanol ou etanol, a temperaturas abaixo de  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , a fim de evitar degradação da cadeia polimérica (YAO, 2000; CHEN *et al.*, 2013). E também se utilizando o ácido sulfâmico em *N,N*-dimetilformamida (DMF) ou diglima (SVENSSON *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2011; LEVDANSKY *et al.*, 2014).

A sulfatação quase homogênea pode acontecer de três formas. Uma delas é quando se utiliza um derivado celulósico (geralmente, acetato de celulose, nitrato de celulose, trimetilsilil celulose) como material de partida e após a reação realiza-se uma clivagem do grupo funcional do derivado inicial (SCHWEIGER, 1979; RICHTER; KLEMM, 2003). Outra forma é quando se realiza a reação de sulfatação e acetilação simultaneamente e posteriormente realiza-se a clivagem do grupo acetila (processo conhecido como acetosulfatação) (ZHANG *et al.*, 2011; PALANINATHAN *et al.*, 2014). E já a terceira forma é quando a celulose se dissolve gradualmente na mistura reacional, resultando em uma solução homogênea, sendo esta forma a utilizada no presente trabalho (ZHANG *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2014).

Para a realização da sulfatação homogênea é necessário a utilização de solventes especiais que promovam a dissolução da celulose. Estes solventes são a mistura de tetróxido de dinitrogênio e *N,N*-dimetilformamida ( $\text{N}_2\text{O}_4/\text{DMF}$ ), *N,N*-Dimetilacetamida/ Cloreto de lítio (DMAc/LiCl) (QIN *et al.*, 2014) e líquidos iônicos como hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM- $\text{PF}_6$ ), acetato de 1-etil-3-metilimidazólio (EMIMAc), cloreto de 1-alil-3-metilimidazólio (AMIMCl) (GERICKE *et al.*, 2009).

Na Figura 9, encontra-se o mecanismo da reação de sulfatação quase homogênea da celulose, utilizando complexo  $\text{HSO}_3\text{Cl}/\text{DMF}$  como reagente sulfatante e DMF como solvente. Inicialmente, ocorre a formação do complexo entre a *N,N*-dimetilformamida e o ácido clorossulfônico. Após a formação do complexo, este é adicionado à celulose suspensa em DMF e no decorrer da reação, as hidroxilas da celulose podem realizar um ataque nucleofílico ao enxofre do complexo. Na Figura 9, está apresentado o ataque realizado pela hidroxila do carbono 6 (C-6). Simultaneamente ao ataque nucleofílico, ocorre a reconstituição da *N,N*-dimetilformamida e o prototropismo (rearranjo intermolecular de hidrogênio) do hidrogênio da hidroxila que atacou o complexo. No meio reacional, a celulose sulfatada formada está na forma ácida e a fim de obtê-la na forma de sal de sódio, a reação é finalizada com a precipitação em solução alcoólica de acetato de sódio.

Figura 9 - Mecanismo da reação de sulfatação da celulose



Fonte: Adaptado de Dionísio *et al.*, 2016.

O sulfato de celulose é amplamente estudado na área biomédica e farmacêutica por ser biocompatível, biodegradável, atóxico, e por exibir efeitos biológicos como anticoagulante e antimicrobiano (WANG *et al.*, 2007; GERICKE *et al.*, 2011; CHRISTENSEN *et al.*, 2001; ZHANG, *et al.*, 2015).

Por apresentar carga negativa, este derivado tem sido bastante utilizado na preparação de complexos polieletrólíticos (PEC) para aplicação como carreadores de fármacos (WANG *et al.*, 2010; TORGER *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2016).

Além disso, na busca por tensoativos biodegradáveis, a hidrofobização do sulfato de celulose tem sido relatada na literatura (HONG *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2014). Yu *et al.* (2014) sintetizaram surfactantes à base de sulfato de celulose com diferentes massas molares, através de esterificações com cloreto de acila C10 – C14.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes

Glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ), ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ), fosfato monossódico ( $NaH_2PO_4$ ), hidróxido de sódio (NaOH), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), N-isopropilacrilamida (NIPAM) 97% de pureza, persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ) e N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), todos estes da Sigma-Aldrich; extrato de levedura e peptona da Difco™; N, N-dimetilformamida (DMF), ácido clorossulfônico ( $HSO_3Cl$ ), acetato de sódio ( $CH_3COONa$ ), etanol (90%) da Vetec e nitrato de amônio cérico IV ( $H_8N_8CeO_{18}$ ) da Acrós Organics. Todos os reagentes não passaram por processo de purificação.

### 4.2 Produção de Celulose Bacteriana

#### 4.2.1 Microorganismo, inóculo e condições de cultivo

A produção de celulose bacteriana foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Embrapa Agroindústria Tropical. Utilizou-se a linhagem *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 e esta foi ativada em meio HS (Composição: 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 5 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 1,5 g.L<sup>-1</sup> ácido cítrico e 2,7 g.L<sup>-1</sup> de fosfato monossódico) a 30 °C por 48 horas, em incubadora refrigerada B.O.D. TE-391, marca Tecnal.

Para o preparo do inóculo adicionou-se 3% da cultura em meio HS esterilizado e incubou-se a 30°C por 72 horas. Já para a produção de CB, foram utilizados 3% do inóculo e este foi incubado, a 30°C por 10 dias sob cultivo estático, em recipientes de vidro (20 × 30 cm) contendo 600 mL de meio HS.

#### 4.2.2 Purificação das películas de Celulose Bacteriana

Após o processo fermentativo, as películas foram removidas da superfície do meio de cultura, cortadas em pequenos pedaços e purificadas com tratamento alcalino, baseado na metodologia utilizada por El-salam (2012), com modificações. Inicialmente, as películas foram lavadas com água corrente a fim de retirar parte do meio remanescente e então, foram imersas em água a 100°C por 1 h e em seguida, em solução de NaOH 2% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% (v/v) por 1 h, a 80 °C. Após essa etapa, realizou-se o procedimento anterior novamente, porém sem a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nas etapas anteriores, foram utilizados 1 L de água e de solução de NaOH por película. Por fim, as películas foram lavadas com água destilada até alcançarem a neutralidade. Este processo foi realizado no Laboratório de Tecnologia da Biomassa da Embrapa Agroindústria Tropical.



### 4.2.3 Desconstrução física das películas

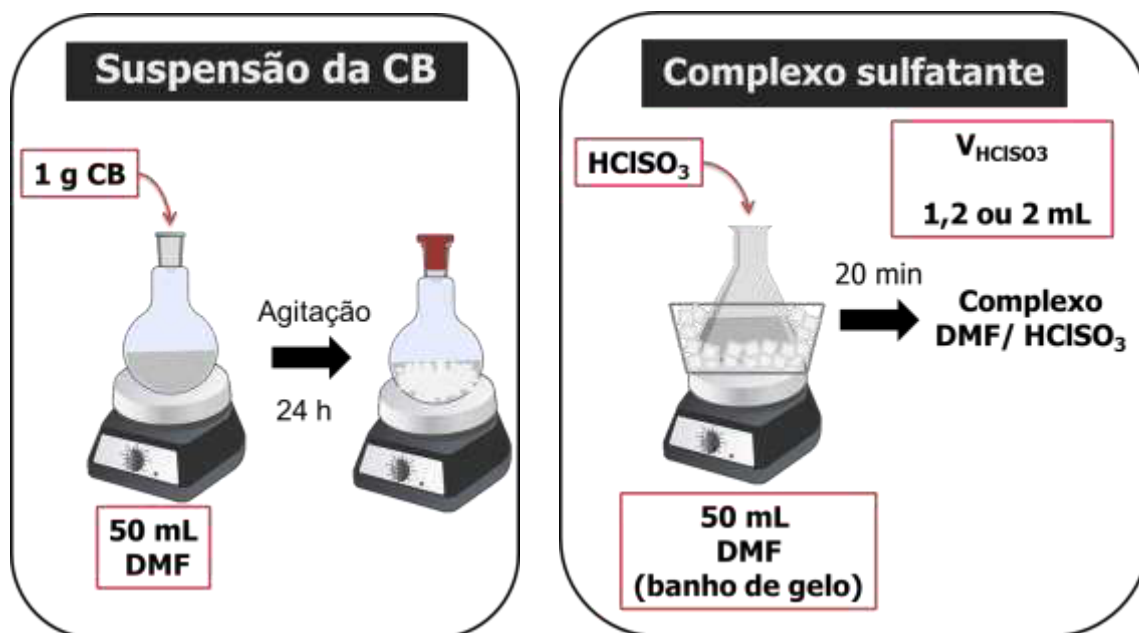
Os pequenos pedaços de CB foram desconstruídos utilizando um Ultraturrax (marca Ika-werne, modelo T50 basic, acoplado com elemento de dispersão S50N-G45G), durante 5 min, a uma potência de 4000 rpm. A polpa de CB obtida foi seca em liofilizador e moída em moinho analítico (marca Ika,).

### 4.3 Síntese do sulfato de celulose bacteriana (SCB)

O sulfato de celulose bacteriana (SCB) foi sintetizado com base na metodologia proposta por Zhang *et al.* (2011), com modificações como discutido a seguir.

Inicialmente, 1 g de CB foi adicionado a 50 mL de DMF e deixada por 24 h, em agitação. Após este período, preparou-se o complexo sulfatante (DMF/HSO<sub>3</sub>Cl). *N,N*-dimetilformamida (50 mL) foi colocado em banho de gelo por 20 min, sob agitação e em seguida ácido clorossulfônico (1,2 ou 2 mL) foram adicionados lentamente (Figura 10).

Figura 10 - Esquema da preparação da suspensão de CB e do complexo DMF/ HSO<sub>3</sub>Cl



Fonte: Elaborado pela autora.

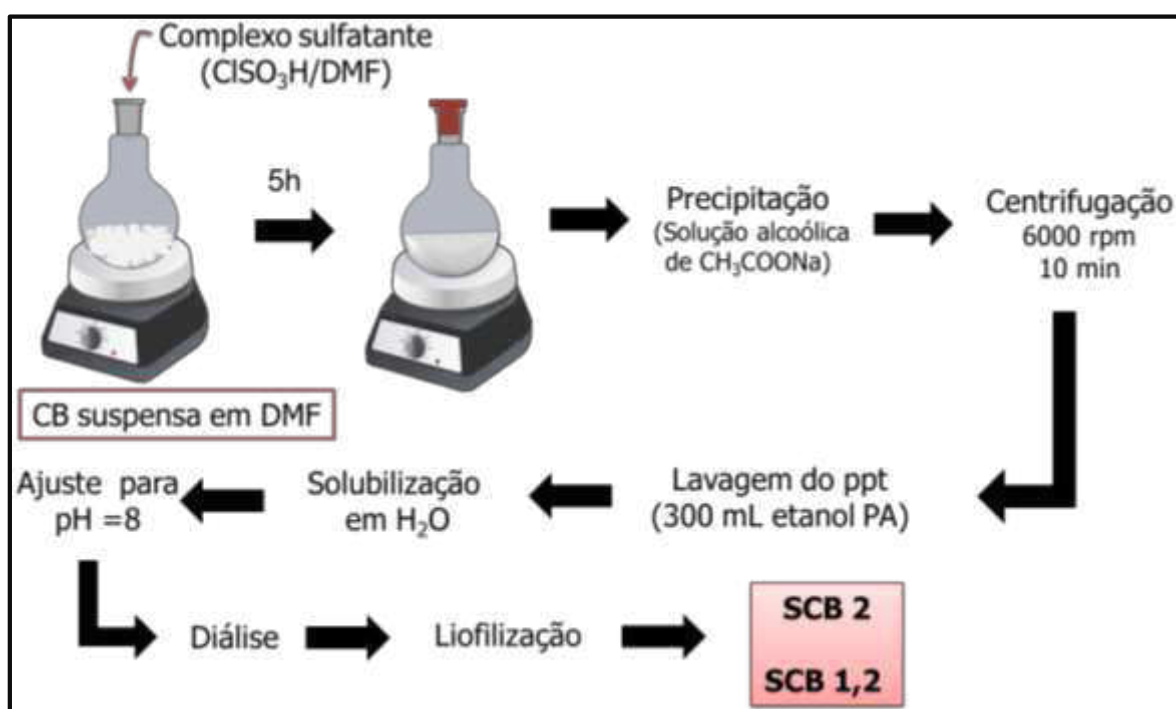
Após o preparo do complexo DMF/HSO<sub>3</sub>Cl, este foi adicionado à suspensão de celulose e a reação prosseguiu a temperatura ambiente por 5h.

Para finalizar a reação, a mistura reacional foi precipitada em 200 mL de solução 2% (m/v) de acetato de sódio em etanol comercial. O precipitado foi coletado por centrifugação (6000 rpm, 10 min) e lavado com 300 mL de etanol PA, em funil de placa sinterizada. Em

seguida, este foi dissolvido em 150 mL de água deionizada e o pH foi ajustado para 8, com solução 1 mol L<sup>-1</sup> de NaOH. A solução foi dialisada contra água destilada por 6 dias (até condutividade igual a 3,72 μS.cm<sup>-1</sup>) para remover as impurezas. E por fim foi liofilizada.

Os derivados sulfatados produzidos foram denominados SCB 1,2 e SCB 2, onde os valores 1,2 e 2 na nomenclatura referem-se ao volume de HSO<sub>3</sub>Cl utilizado no preparo do complexo sulfatante. Na Figura 11, encontra-se um esquema da metodologia da reação de sulfatação e na Tabela 2, estão relacionados os produtos obtidos com as respectivas condições reacionais.

Figura 11 - Esquema da reação de sulfatação



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2 - Condições reacionais da síntese do sulfato de celulose bacterina

Produtos	Volume de HSO <sub>3</sub> Cl adicionado (mL)	Mols de HSO <sub>3</sub> Cl adicionado	Razão molar HSO <sub>3</sub> Cl/CB
SCB 1,2	1,2	0,018	2,92
SCB 2	2	0,030	4,87

Massa de CB constante em 1,00 g. Tempo de reação constante em 5 h

#### 4.4 Síntese dos copolímeros de SCB enxertados com PNIPAM

Os copolímeros de SCB enxertados com PNIPAM foram sintetizados por polimerização radicalar, utilizando dois iniciadores químicos: KPS e CAN.

##### 4.4.1 Síntese dos copolímeros utilizando KPS

A síntese utilizando o iniciador KPS baseou-se na metodologia realizada por (Shi e Zhang (2007) com modificações. Inicialmente, preparou-se uma solução 1% de SCB (100 mg de SCB em 10 mL). Gás nitrogênio foi borbulhado na solução de SCB, por 30 min, e em seguida, o iniciador KPS (5 mg), o acelerador TEMED (3,5  $\mu$ L) (Razão molar KPS/TEMED = 1) e o monômero NIPAM (46 mg) foram adicionados ao sistema, com intervalo de 10 min entre as adições de cada um. A reação prosseguiu por 4 h, em atmosfera de N<sub>2</sub>. A reação foi realizada à temperatura ambiente (TA = 25  $\pm$  1 °C) e a 60 °C.

O meio reacional foi precipitado em 60 mL de acetona por 20 min, em seguida, realizou-se uma centrifugação. Para a remoção dos homopolímeros (PNIPAM) formados durante a síntese, o produto obtido passou por um processo de purificação, onde este foi suspenso em 60 mL de acetona por 48 h. Após a purificação, os copolímeros foram solubilizados em água e liofilizados. A razão (massa/massa) entre SCB e NIPAM utilizada nas sínteses foi de 1:0,46.

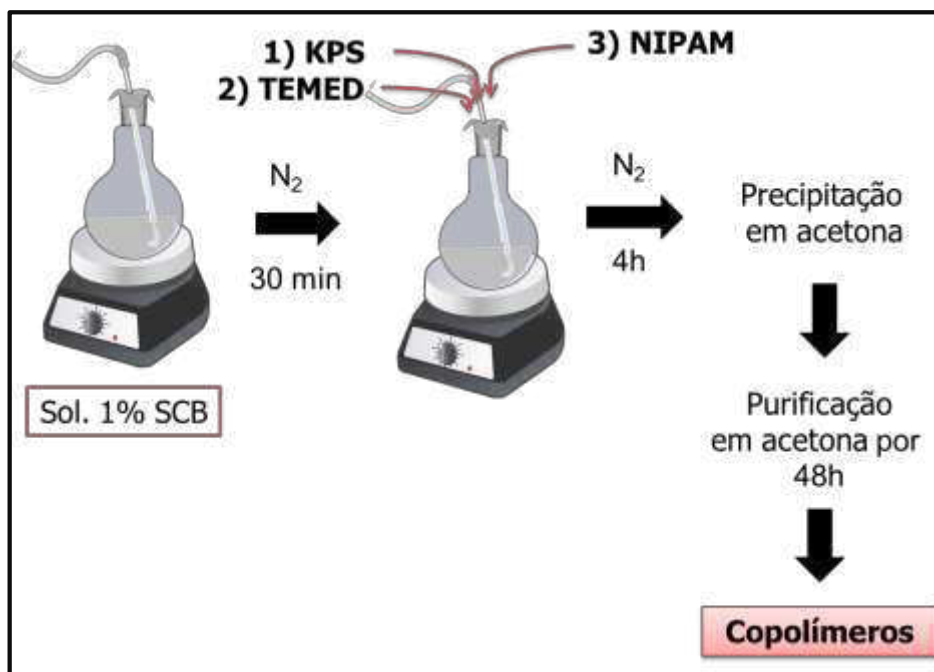
Na Figura 12, encontra-se um esquema da metodologia da reação de enxertia utilizando o iniciador KPS e na Tabela 3 estão sumarizadas as condições reacionais dos copolímeros sintetizados, onde estão indicadas as massas de KPS e NIPAM utilizadas. Os números 1 e 2 na nomenclatura referem-se às amostras de sulfato de celulose bacteriana SCB 1,2 e SCB 2h, respectivamente, que foram utilizadas nas sínteses.

Tabela 3 - Condições reacionais das sínteses dos copolímeros sintetizados com KPS

Copolímeros	SCB	Temperatura (°C)
<b>KPS5NIPAM46TA (1)</b>	SCB 1,2	TA
<b>KPS5NIPAM46 (1)</b>	SCB 1,2	60
<b>KPS5NIPAM46 (2)</b>	SCB 2	60

Massa de CB, KPS e NIPAM constantes em 100, 5 e 46 mg. Tempo de reação constante em 4 h. TA = 25  $\pm$  1 °C.

Figura 12 - Esquema da reação de enxertia utilizando o iniciador KPS



Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.4.2 Síntese dos copolímeros utilizando CAN

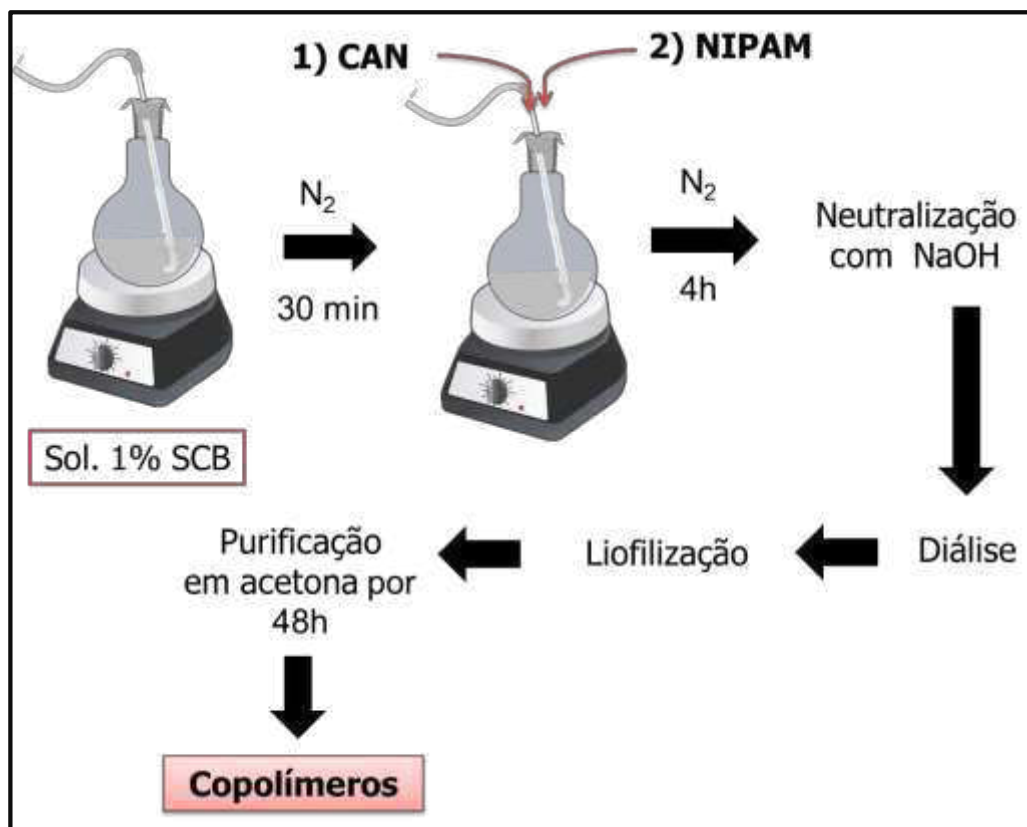
A síntese utilizando o iniciador CAN foi baseada na metodologia realizada por Abreu *et al.*, 2016, com modificações. Uma solução aquosa (10 mL) a 1% de SCB foi preparada e após, gás nitrogênio ( $N_2$ ) foi borbulhado na solução por 30 min e o iniciador CAN, dissolvido em 1 mL de  $HNO_3$  0,1 mol  $L^{-1}$  foi adicionado ao sistema. Posteriormente, o monômero NIPAM, dissolvido em 9 mL de  $H_2O$ , foi adicionado ao meio reacional e a reação prosseguiu por 4 h em atmosfera de  $N_2$ . A reação foi realizada à temperatura ambiente ( $TA = 25 \pm 1 \text{ } ^\circ C$ ) e a  $60 \text{ } ^\circ C$ .

Para finalizar a reação, o meio reacional foi neutralizado com solução de NaOH 1 mol  $L^{-1}$ , a mistura foi dialisada contra água destilada (com acompanhamento da condutividade) e por fim liofilizada. As razões (massa/massa) entre SCB e NIPAM utilizadas nas sínteses foram de 1:0,46 e 1:1.

A fim de remover os homopolímeros (PNIPAM) formados durante a reação, os copolímeros foram purificados com acetona (60 mL), sob agitação, por 48 h. Após a purificação, os copolímeros foram solubilizados em água e secos por liofilização.

Na Figura 13, encontra-se um esquema da metodologia da reação de enxertia utilizando o iniciador CAN e as condições reacionais dos copolímeros sintetizados encontram-se na Tabela 4. Os números 1 e 2 na nomenclatura referem-se às amostras de sulfato de celulose bacteriana SCB 1,2 e SCB 2, respectivamente, que foram utilizadas nas sínteses.

Figura 13 - Esquema da reação de enxertia utilizando o iniciador CAN



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 - Condições reacionais das sínteses dos copolímeros sintetizados com CAN

Copolímeros	Iniciador (mg)	NIPAM (mg)	SCB	Temperatura (°C)
CAN5NIPAM46 (2)	5	46	SCB 2	60
CAN10NIPAM46 (2)	10	46	SCB 2	60
CAN24NIPAM46 (2)	24	46	SCB 2	60
CAN24NIPAM46TA (2)	24	46	SCB 2	TA
CAN24NIPAM100 (2)	24	100	SCB 2	60
CAN24NIPAM46 (1)	24	46	SCB 1,2	60

Massa de CB constante em 100 mg. Tempo de reação constante em 4 h. TA = 25 ± 1°C.

#### 4.4.3 Rendimento da reação de enxertia (RE%)

O rendimento das reações de enxertia foi calculado a partir da equação 1.

$$RE\% = \frac{m_{CP} \times 100}{m_{SCB} + m_{NIPAM}} \quad (1)$$

Onde:  $m_{CP}$  é a massa de copolímero purificado;  $m_{SCB}$  é a massa de celulose bacteriana sulfatada e  $m_{NIPAM}$  é a massa de N-isopropilacrilamida.

#### 4.5 Preparação das nanopartículas

Os copolímeros sintetizados com PNIPAM devem apresentar a propriedade de termossesibilidade e em meio aquoso tendem a se auto-organizar formando nanopartículas. Diante disto, a preparação das nanopartículas foi realizada por auto-organização, através do aquecimento de soluções dos copolímeros com concentrações de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  (ABREU *et al.*, 2016).

#### 4.6 Caracterizações

##### 4.6.1 Análise Elementar (AE)

Os teores de nitrogênio, carbono e enxofre dos derivados sulfatados foram determinados por microanálise elementar utilizando o equipamento Series II CHNS/O Analyzer da PerkinElmer. A análise foi realizada em duplicata no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

##### 4.6.2 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A CB, os derivados sulfatados e os copolímeros produzidos foram caracterizados por FTIR a fim de confirmar a presença das bandas características de celulose bacteriana na amostra de CB, e confirmar a reação de sulfatação e de enxertia. Para realizar a análise utilizou-se pastilhas de brometo de potássio (KBr) e equipamento FTIR – 8500 da Shimadzu, faixa de  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$  e 25 varreduras. Análise realizada no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

##### 4.6.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As amostras de SCB foram caracterizadas por RMN  $^{13}\text{C}$  a fim de confirmar a reação de sulfatação. E copolímeros foram caracterizados por RMN  $^1\text{H}$ . As análises foram

realizadas em equipamento Bruker Modelo Avance DRX500 a 25°C, em água deuterada. Realizado no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN).

#### **4.6.4 Difração de Raios-X (DRX)**

Os difratogramas de raios X da CB e dos derivados sulfatados foram obtidos em difratômetro modelo DMAXB – Rigaku com tubo de Cu. O intervalo angular (em  $2\theta$ ) utilizado foi de 3° a 50° com uma velocidade de varredura de 0,5°/min. Realizado no laboratório de Raios-X da Universidade Federal do Ceará.

#### **4.6.5 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)**

O volume de eluição ( $V_e$ ) e a massa molar de pico ( $M_p$ ) dos derivados sulfatados foram determinados por Cromatografia de Permeação em Gel através de um equipamento Shimadzu acoplado a um detector de índice de refração (RID-6A). A fase móvel utilizada foi  $\text{NaNO}_3(\text{aq})$  0,1 mol/L, à temperatura ambiente e fluxo de 1 mL/min. O GPC foi calibrado com padrões de pululana e o volume injetado das amostras foi de 50  $\mu\text{L}$ . Análise realizada no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

#### **4.6.6 Concentração de associação crítica (CAC)**

A concentração de associação crítica foi determinada por espectrofluorimetria utilizando o pireno como sonda fluorescente, conforme realizado por Patrizi *et al.*, (2009).

Soluções dos copolímeros CAN24NIPAM46 (2) e CAN24NIPAM100 (2) nas concentrações de  $2 \times 10^{-3}$  a 1  $\text{mg mL}^{-1}$  foram preparadas utilizando uma solução aquosa de pireno  $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Os espectros de excitação (310 – 360 nm) das soluções, a 25 e 50 °C, foram obtidos utilizando um espectrofluorímetro (RF 600 SHIMADZU) e aplicando um comprimento de onda de emissão ( $\lambda_{em}$ ) de 374 nm e largura da fenda de 5 nm.

#### **4.6.7 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)**

A temperatura de transição de fase (LCST) e o tamanho das nanopartículas formadas foram determinados por Espalhamento de Luz Dinâmico, utilizando equipamento Nano Zeta Sizer Malvern, Modelo ZS 3600, com laser no comprimento de onda 633 nm e ângulo de espalhamento de 173°.

O tamanho das nanopartículas foi determinado em função da temperatura, no intervalo de 25 a 50 °C. Soluções dos copolímeros na concentração de 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$  foram

aquecidas no intervalo de 25 a 50 °C e as medidas de tamanho foram realizadas a cada aumento de 1°C. O aquecimento das amostras foi realizado próprio equipamento, em cubeta de vidro e tempo de equilíbrio térmico de 4 minutos antes da análise.

Para avaliar a reversibilidade da formação das nanopartículas com o aquecimento foram realizados 4 ciclos de aquecimento e resfriamento a 25 e 50 °C.

Realizado no Laboratório de polímeros da UFC.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Síntese, rendimento e grau de sulfatação dos derivados sulfatados

A sulfatação da celulose bacteriana foi realizada utilizando complexo HSO<sub>3</sub>Cl/DMF em DMF, variando-se a quantidade de HSO<sub>3</sub>Cl. Inicialmente, a reação mostrou-se heterogênea e após uma hora de reação o meio tornou-se homogêneo. Este fato também foi observado por Zhu *et al.* (2014) ao também realizarem sulfatação de celulose bacteriana com complexo HSO<sub>3</sub>Cl/DMF em DMF e por Zhang *et al.* (2011) ao sulfatarem celulose microcristalina com o mesmo complexo sulfatante e solvente citados anteriormente.

O GS é definido como o número de grupos SO<sub>3</sub><sup>-</sup> por unidade monossacarídica. Como a unidade fundamental da celulose é a glicose, pode-se determinar o GS, utilizando análise elementar, relacionando-se o teor de enxofre (%S) devido a inserção dos grupos SO<sub>3</sub>Na com o teor de carbono (C%), sabendo que a unidade glicosídica possui 6 carbonos (Equação 4) (ZHANG *et al.*, 2011). Os teores de carbono e enxofre obtidos encontram-se na Tabela 6.

$$GS = \frac{S\% / 32}{C\% / 6 \times 12} \quad (4)$$

Onde: 32 é a massa molar do enxofre, 12 é a massa molar do carbono e 6 é o número de carbonos por unidade glicosídica.

Tabela 5 - Teores de enxofre e carbono presentes nos derivados sulfatados e valores de grau de sulfatação

Amostras	%S	%C	GS
SCB 1,2	9,16	25,72	0,80
SCB 2	12,92	18,59	1,56

Para o cálculo do rendimento considera-se uma dependência do grau de sulfatação e estes foram calculados levando em conta que a introdução de cada grupo SO<sub>3</sub>Na causa um aumento de 102 g mol<sup>-1</sup> (MOURA NETO *et al.*, 2011) (Equação 3).

$$RS\% = 100 \times \frac{m_{SCB}}{\left[1 + \left(\frac{GS \times 102}{162}\right)\right] \times m_{CB}} \quad (3)$$

Onde: 162 g mol<sup>-1</sup> é a massa molar da unidade glicosídica.

Na Tabela 5 estão apresentadas a razão molar entre  $\text{HSO}_3\text{Cl}$  e SCB, as massas de SCB obtidas e os rendimentos reacionais. Nota-se que foram obtidas massas de SCB maiores que a massa de CB inicial (1g). Sabe-se que através da reação de sulfatação cada átomo de hidrogênio das hidroxilas presentes na unidade glicosídica da celulose pode ser substituído por um grupo  $\text{SO}_3\text{Na}$  com massa molar bem mais elevada. Assim, após a reação de sulfatação espera-se um aumento da massa do produto em relação à massa do polissacarídeo adicionado inicialmente.

Tabela 6 - Valores das razões molares  $\text{HSO}_3\text{Cl}/\text{CB}$  utilizadas nas reações de sulfatação, das massas obtidas de SCB e dos rendimentos

<b>Produtos</b>	<b>Razão molar (<math>\text{HSO}_3\text{Cl}/\text{CB}</math>)</b>	<b>SCB (g)</b>	<b>RS %</b>
<b>SCB 1,2</b>	2,92	1,31 ± 0,08	87,3 ± 5,6
<b>SCB 2</b>	4,87	2,00 ± 0,02	100,9 ± 0,9

A quantidade de ácido clorossulfônico foi variada a fim de se obter dois derivados com graus de substituição distintos. Foi observado que ao aumentar o volume de  $\text{HSO}_3\text{Cl}$  (1,2 mL para 2 mL) e mantendo o tempo de reação constante, o valor do rendimento foi aumentado em 13,6 %, bem como ocorreu uma pronunciada elevação no valor do grau de sulfatação.

Tanto amostras de celulose de origem vegetal quanto de origem bacteriana já foram sulfatadas, em meio homogêneo, quase homogêneo e heterogêneo, com a utilização de diferentes reagentes e solventes. Na Tabela 7, estão sumarizados alguns resultados obtidos por diferentes métodos de sulfatação para uma melhor comparação com os resultados alcançados neste trabalho.

Zhu *et al.* (2014) também sintetizaram sulfato de celulose bacteriana com complexo  $\text{HSO}_3\text{Cl}/\text{DMF}$ , por meio de sulfatação quase homogênea. Ao aumentar a quantidade de reagente sulfatante, os autores observaram um aumento do GS e uma redução do rendimento. No presente trabalho a mesma tendência para o GS foi observada, porém para o rendimento obsevou-se o contrário.

A celulose bacteriana também passou pelo processo de sulfatação, em meio homogêneo, utilizando-se  $\text{DMAc}/\text{LiCl}$  (N,N-Dimetilacetamida/Cloreto de lítio) como solvente e  $\text{SO}_3/\text{piridina}$  como complexo sulfatante. Qin *et al.* (2014), ao utilizarem razões molares de

reagente sulfatante/UG próximas ao do presente trabalho, alcançaram valores GS inferior. Isto indica que o método de sulfatação utilizado neste trabalho mostrou-se mais eficiente.

No trabalho desenvolvido por Zhang *et al.* (2011), celulose vegetal foi convertida em sulfato de celulose, utilizando complexo  $\text{HSO}_3\text{Cl}/\text{DMF}$ , durante uma sulfatação quase homogênea. Observa-se que o GS alcançado ao utilizar razão molar  $\text{HSO}_3\text{Cl}/\text{UG}$  igual a 4,5 por 6 h foi superior ao obtido no presente trabalho, mesmo utilizando uma condição similar.

Muitos outros polissacarídeos, além da celulose já foram sulfatados por vários métodos (Tabela 8). Pires *et al.* (2013) sulfataram a quitosana, polissacarídeo que assim como a celulose não é solúvel em água. Foram obtidos rendimentos de 22% e 48% ao utilizarem razões molares  $\text{HSO}_3\text{Cl}/\text{UG}$  iguais a 5,5 (5 h) e 4,8 (3 h), respectivamente, e obtiveram GS de 0,67 e 0,87 em ordem crescente das razões molares. Moura Neto *et al.* (2011; 2014) sulfataram goma do cajueiro e galactomanana, polissacarídeos solúveis em água. Ao observar os resultados de rendimento e GS obtidos conclui-se que foram necessárias quantidades elevadas de  $\text{HSO}_3\text{Cl}$  para se obter GS entre 0,24 e 0,88 e baixos rendimentos.

Ochoa *et al.*, 2017 realizaram a sulfatação de fucogalactana (polissacarídeo solúvel em água extraído do cogumelo *Agaricus bisporus*) utilizando ácido clorossulfônico como reagente sulfatante. Foram alcançados rendimentos acima de 100% e elevado valor de GS. Porém, para isso foram necessários uma elevada quantidade de  $\text{HSO}_3\text{Cl}$ .

Tabela 7 - Resultados obtidos por diferentes métodos de sulfatação de celulose bacteriana e vegetal

Material de partida	Agente sulfatante - Solvente	Temperatura (°C)	RS/UG <sup>a</sup>	Tempo (h)	Rendimento (%)	GS	Referência
Celulose bacteriana	HSO <sub>3</sub> Cl/DMF - DMF	25	2,92	5	131,3 <sup>b</sup>	0,80 <sup>d</sup>	Neste trabalho
			4,87	5	201,6 <sup>b</sup>	1,56 <sup>d</sup>	
Celulose bacteriana	HSO <sub>3</sub> Cl/DMF - DMF	25	3	4	90,3 <sup>c</sup>	0,36 <sup>e</sup>	ZHU <i>et al.</i> , 2014
			3	6	89,1 <sup>c</sup>	0,33 <sup>e</sup>	
			6	4	49,1 <sup>c</sup>	0,86 <sup>e</sup>	
Celulose bacteriana	SO <sub>3</sub> /piridina - DMAc/LiCl	27	6	6	81,3 <sup>c</sup>	0,52 <sup>e</sup>	QIN <i>et al.</i> , 2014
			3	6	-	0,12 <sup>e</sup>	
			6	6	-	0,56 <sup>e</sup>	
Celulose vegetal	HSO <sub>3</sub> Cl/DMF - DMF	30	12	6	54,5 <sup>b</sup>	1,33 <sup>e</sup>	WANG <i>et al.</i> , 2007
Celulose vegetal	HSO <sub>3</sub> Cl/DMF - DMF	25	4,5	6	-	2,15 <sup>d</sup>	ZHANG <i>et al.</i> , 2011
			6	3	-	1,99 <sup>d</sup>	
Celulose vegetal	H <sub>3</sub> NSO <sub>3</sub> - DMF	80	6	5	145,9 <sup>b</sup>	1,89 <sup>d</sup>	ZHANG <i>et al.</i> , 2011
		70	15	24	143,0 <sup>b</sup>	1,78 <sup>d</sup>	
Celulose vegetal	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - Propanol	-5	10,4	2	63,3 <sup>c</sup>	0,39 <sup>c</sup>	YAO <i>et al.</i> , 2000

<sup>a</sup> Razão molar do reagente de sulfatação por unidade glicosídica; <sup>b</sup> calculado pela equação 2; <sup>c</sup> não informado como foi calculado; <sup>d</sup> calculado pela equação 4; <sup>e</sup> calculado por outra equação.

Tabela 8 - Resultados obtidos por diferentes métodos de sulfatação de polissacarídeos

Material de partida	Agente sulfatante - Solvente	Temperatura (°C)	RS/UG <sup>a</sup>	Tempo (h)	Rendimento (%)	GS	Referência
Celulose bacteriana	HSO <sub>3</sub> Cl/DMF -	25	2,92	5	131,3 <sup>b</sup>	0,80 <sup>d</sup>	Neste trabalho
	DMF		4,87	5	201,6 <sup>b</sup>	1,56 <sup>d</sup>	
Quitosana	HSO <sub>3</sub> Cl/DMF -	25	4,8	3	48,0 <sup>b</sup>	0,67 <sup>c</sup>	PIRES <i>et al.</i> , 2013
	DMF		5,5	5	22,0 <sup>b</sup>	0,87 <sup>c</sup>	
Goma do cajueiro	HSO <sub>3</sub> Cl/piridina/FA - FA	4	4,9	24	53,7 <sup>c</sup>	0,02 <sup>d</sup>	MOURA
			14,6	24	29,9 <sup>c</sup>	0,24 <sup>d</sup>	NETO <i>et al.</i> , 2011
			19,4	24	23,3 <sup>c</sup>	0,88 <sup>d</sup>	MOURA
Galactomanana ( <i>D. gardneriana</i> )	HSO <sub>3</sub> Cl/piridina/FA - FA	4	19,5	24	64,9 <sup>c</sup>	0,32 <sup>d</sup>	NETO <i>et al.</i> , 2014
Fucogalactana ( <i>Agaricus bisporus</i> )	HSO <sub>3</sub> Cl/piridina/FA - FA	8	54	6	145,5 <sup>e</sup>	2,8 <sup>c</sup>	OCHOA <i>et al.</i> , 2017

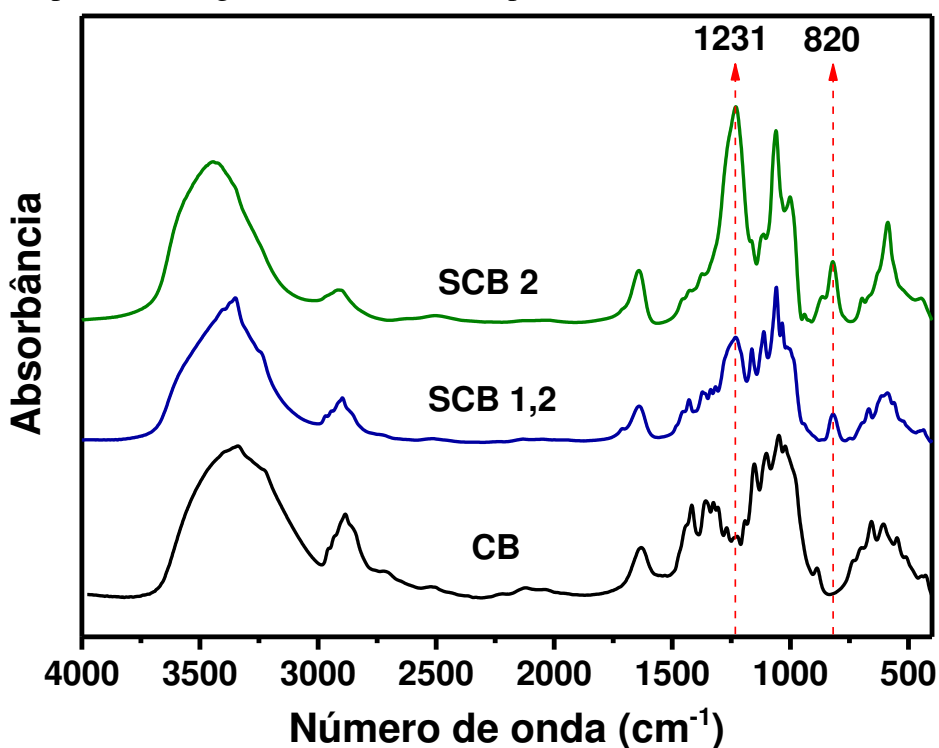
<sup>a</sup> Razão molar do reagente de sulfatação por unidade glicosídica; <sup>b</sup> calculado pela equação 2; <sup>c</sup> calculado por outras equações; <sup>d</sup> calculado pela equação 4; <sup>e</sup> não informado como foi calculado.

## 5.2 Caracterizações da celulose bacteriana e do sulfato de celulose bacteriana

### 5.2.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A celulose bacteriana apresenta espectro característico de um polissacarídeo neutro com bandas em 3335, 2886 e 1048  $\text{cm}^{-1}$  devido às vibrações de estiramento O-H,  $\text{CH}_2$  e C-O-C da estrutura do anel da piranose, respectivamente (QIN *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2014). Comparando o espectro da CB com os dos seus derivados sulfatados (Figura 14) observa-se o deslocamento da banda de estiramento -OH para números de onda maiores (de 3335  $\text{cm}^{-1}$  para 3363 e 3436  $\text{cm}^{-1}$  para SCB 1,2 e SCB 2, respectivamente) com o aumento da quantidade de reagente sulfatante. Este deslocamento é um indicativo da quebra das ligações de hidrogênio intermoleculares durante a reação de sulfatação (WANG *et al.*, 2007).

Figura 14 - Espectros na região do infravermelho para a CB e as amostras de SCB



A efetividade da reação de sulfatação foi confirmada com o aparecimento de duas novas bandas. A banda em 820  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída às vibrações de estiramento de C-O-S e a banda em 1231  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento assimétrico de O=S=O (QIN *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2014). A razão das absorbâncias das bandas em 1233 (devido a C-O-S) e 1048  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C das unidades de glicose) para as amostras SCB 1,2 e SCB 2 são respectivamente 0,34 e 1,11

indicando que o aumento da quantidade de reagente sulfatante aumentou o grau de sulfatação, confirmando os dados observados por análise elementar.

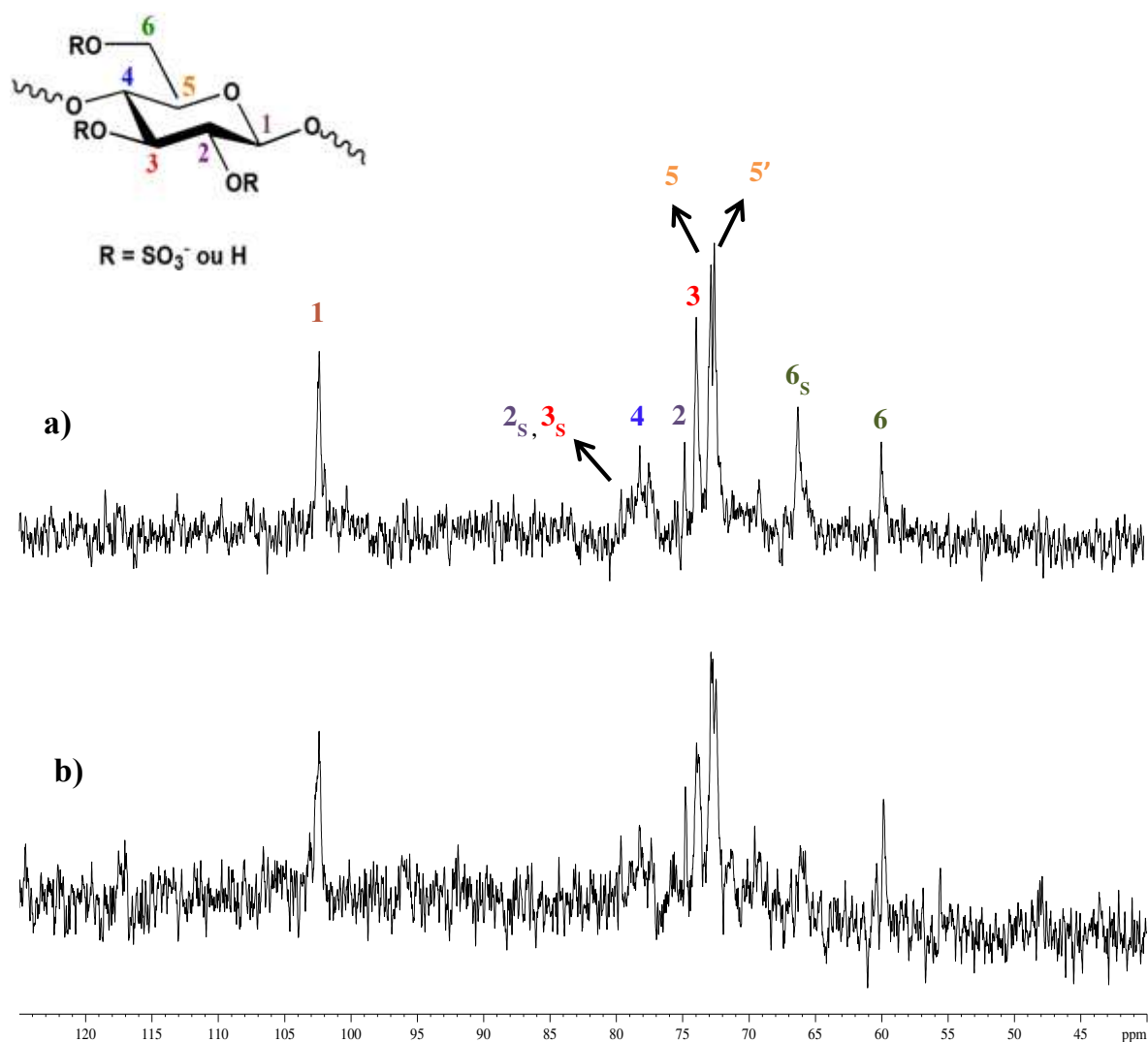
### 5.2.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

RMN  $^{13}\text{C}$  de homopolissacarídeos como a celulose possuem quatro regiões típicas de deslocamento químico. A região entre 90 – 100 ppm é devido ao carbono anomérico (C-1), o carbono envolvido na ligação glicosídica (C-4 no caso da celulose) são geralmente encontrados na região entre 78 e 80 ppm, carbono primário (C-6) aparece em aproximadamente 60 ppm enquanto os carbonos de C-2 a C-5 são observados entre 70 e 75 ppm. Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  para os derivados sulfatados da celulose, em  $\text{D}_2\text{O}$ , estão mostrados na Figura 15. Os deslocamentos químicos devido aos carbonos da unidade monomérica da glicose são observados em 102,4 (C-1); 74,1 (C-2), 73,8 (C-3); 78,2 (C-4); 72,7 (C-5) e 59,9 (C-6) ppm e estão de acordo com a literatura (ZHANG *et al.*, 2011; QIN *et al.*, 2014). Zhu *et al.*, (2014) também caracterizaram a celulose sulfatada por RMN  $^{13}\text{C}$ , entretanto os deslocamentos dos carbonos C-1 a C-6 estão deslocados para uma região de menor deslocamento químico. Na Figura 15 também são observados outros sinais de carbonos além dos seis dos anéis da celulose e isto ocorre devido ao deslocamento químico provocado pela inserção dos grupos sulfato na celulose.

De acordo com a literatura, a ordem de reatividade das três hidroxilas da celulose é: C-6 > C-2 > C-3 devido aos diferentes impedimentos estéricos nestas posições (ZHANG *et al.*, 2011; QIN *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2014). Esses carbonos ao serem sulfatados provocam um deslocamento dos sinais para a esquerda do espectro (campo baixo) devido à desproteção magnética dos núcleos dos carbonos, com isso, os átomos de carbono passam a perceber um campo magnético efetivo maior e entram em ressonância em frequências mais altas.

O novo sinal em 66,2 ppm (Figura 15) é atribuído ao carbono 6 sulfatado (C'-6). Esse sinal é mais intenso na amostra SCB 2 do que na SCB 1,2, confirmando os resultados de análise elementar e infravermelho. A substituição do grupo OH do C-6 provoca também uma mudança de deslocamento químico do C-5 para uma região de campo mais alto (de 72,7 para 72,5 ppm). Os sinais referentes aos carbonos C-2 e C-3 (73,8 e 72,9 ppm respectivamente) sulfatados foram deslocados para 79,2 ppm (ZHANG *et al.*, 2011; QIN *et al.*, 2014).

Figura 15 - Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  para os derivados: (a) SCB 2 (b) SCB 1,2



### 5.2.3 Difração de Raios-X

Os difratogramas da CB e dos derivados sulfatados estão apresentados na Figura 16. A celulose bacteriana apresentou picos característicos de celulose do tipo I e II, indicando que durante o processo de purificação houve conversão parcial da celulose do tipo I em tipo II. Os picos de difração em  $2\theta = 14,3$ ;  $17,0$ ;  $22,8$  e  $34,6$  são relativos a celulose I, enquanto o pico em  $2\theta = 12$  é de celulose II (SÈBE *et al.*, 2012).

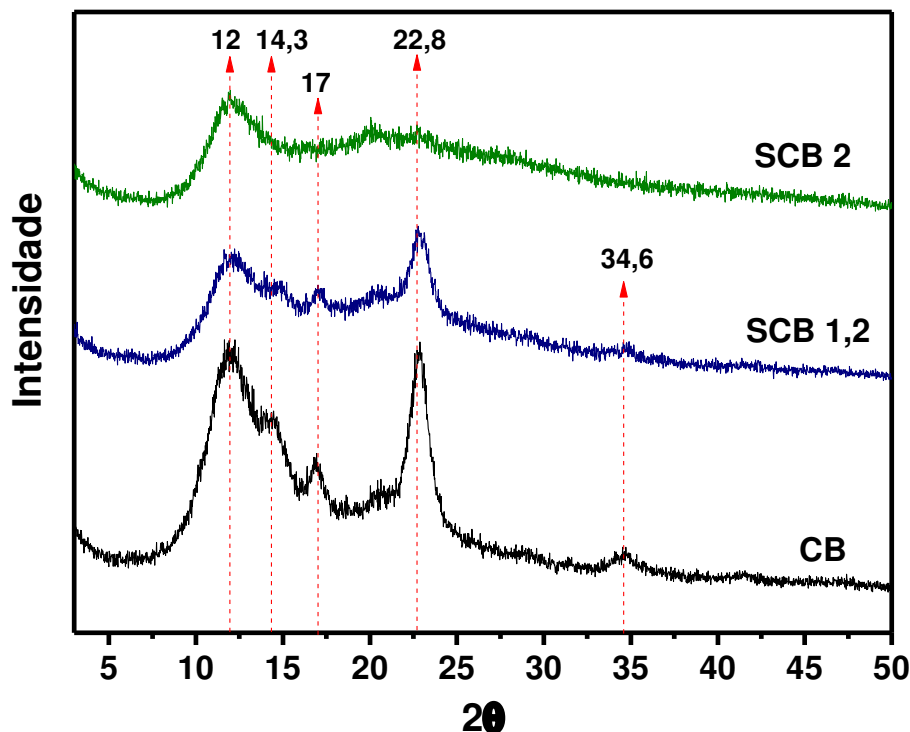
Observa-se que o derivado SCB 1,2 apresentou perfil semelhante ao da celulose bacteriana de partida, enquanto que o derivado SCB 2 mudou o perfil com a sulfatação. Os picos em  $2\theta = 14,3$ ;  $17,0$ ;  $22,8$  e  $34,6$  desaparecem permanecendo apenas o pico em  $2\theta = 12,0$  característico de celulose II que é mais estável que celulose I. Portanto, o aumento da quantidade de reagente sulfatante levou à amorfização do derivado SCB 2. Indicativo da quebra



das ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose e como consequência disto o derivado torna-se solúvel em água.

Qiu *et al.* (2014) ao realizarem a sulfatação de celulose bacteriana, com perfil de celulose do tipo I, observaram que as regiões cristalinas da celulose de origem foram destruídas (amorfização) e ocorreu a conversão em celulose II.

Figura 16 - Difratogramas da CB e dos derivados sulfatados SCB 1,2 e SCB 1,2



#### 5.2.4 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

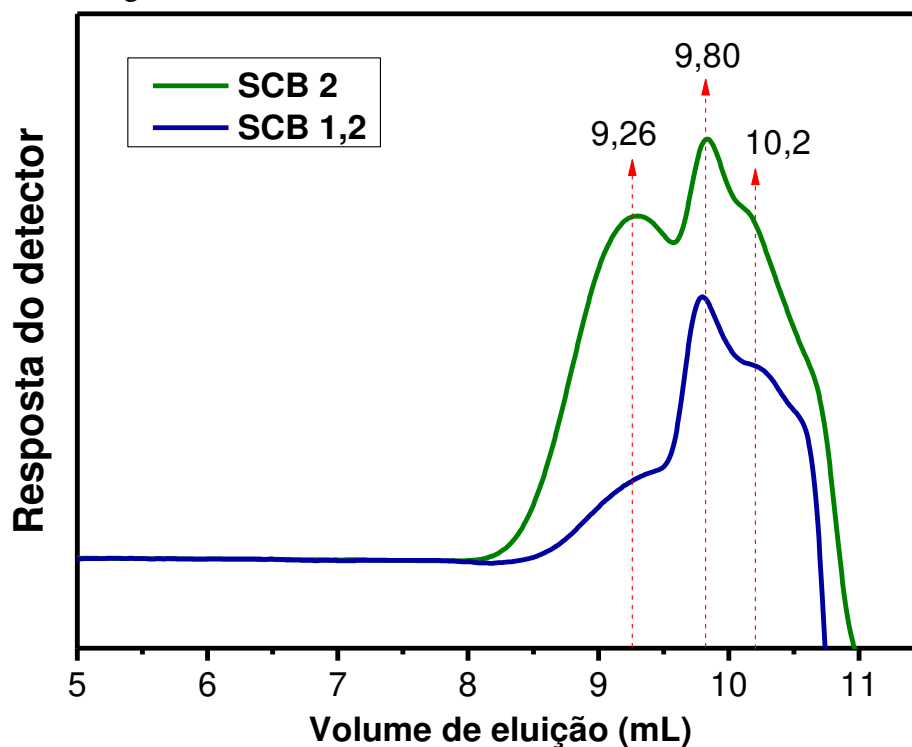
Na Figura 17, estão apresentados os cromatogramas dos derivados sulfatados. Observa-se que todos apresentaram um perfil bastante semelhante e mostraram-se multimodal, com a presença de um ombro em 10,20 mL.

A intensidade da banda relativa ao  $V_e = 9,26$  mL torna-se mais elevada com o aumento da quantidade de reagente sulfatante. Isto indica um crescimento do número de moléculas com maiores massas molares, o que está de acordo com a microanálise que apresentou uma tendência de aumento do percentual de enxofre.

A massa molar da celulose bacteriana pode variar de  $3,2 \times 10^5$  a  $9,7 \times 10^5$  g mol<sup>-1</sup> (GP 2000 - 6000) (PECORARO *et al.*, 2008). Para os derivados sulfatados, as massas molares de pico foram  $1,20 \times 10^4$  e  $1,65 \times 10^3$  g mol<sup>-1</sup>, referentes aos volumes de eluição 9,26 e 9,80 mL, respectivamente para SCB 1,2 e SCB 2. A diminuição da massa molar indica que a CB foi degradada durante a sulfatação e isso se deve ao meio reacional ser ácido. A degradação

promoveu à formação de macromoléculas com massas molares variadas (ZHANG *et al.*, 2011; QIN *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2014).

Figura 17 - Cromatogramas dos sulfatos de celulose bacteriana sintetizados



Qin *et al.* (2014) e Zhu *et al.* (2014) realizaram sulfatação de celulose bacteriana e celulose microcristalina pelo método homogêneo e quase homogêneo, respectivamente. Os autores observaram que a despolimerização na CB foi mais severa que na celulose microcristalina, por ela possuir fibras mais finas. No trabalho de Zhu *et al.* (2014), que realizou o mesmo método de sulfatação deste trabalho a massa molar da celulose bacteriana diminuiu de  $6,1 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$  para  $2,5 \times 10^3$  a  $1,6 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$  enquanto a da celulose vegetal reduziu de  $6,2 \times 10^4$  para  $1,3 \times 10^4$  a  $3,6 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ .

### 5.3 Síntese e caracterização dos copolímeros utilizando o iniciador persulfato de potássio (KPS)

#### 5.3.1 Síntese dos copolímeros

Estudos realizados por Tan *et al.*, (1998), na síntese de copolímeros com carboximetilcelulose com acrilamida e metacrilato de dimetilaminoetila, mostraram que o TEMED melhora a eficiência da iniciação do KPS, pois radicais derivados do TEMED também são formados e ajudam a etapa de iniciação da polimerização.

Para avaliar o efeito do KPS na reação de sulfatação utilizou-se SCB 1,2 e 2 a 60 °C e a temperatura ambiente. Observou-se que a medida que a reação prosseguia a solução tornava-se esbranquiçada. Isto já era esperado, pois o PNIPAM sofre transição de fase (hidrofílico/hidrofóbico) em temperaturas acima de 32 °C e com isso ocorre a sua precipitação. Shi e Zhang (2007) enxertaram NIPAM em carboximetil hidroxipropil goma guar utilizando KPS/TEMED e concluíram que o aumento da temperatura favorece a ativação dos radicais do monômero e da cadeia do polissacarídeo o que leva ao aumento da enxertia.

### ***5.3.2 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)***

Na Figura 18, estão mostrados os espectros dos copolímeros sintetizados e do homopolímero removido no processo de purificação dos copolímeros. O homopolímero removido apresentou bandas características de poli N-isopropilacrilamida. As bandas em 3447 e 3300  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento N-H de amida, em 2972  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada à vibração de estiramento C-H do grupo isopropil. Em 1651  $\text{cm}^{-1}$  atribui-se ao estiramento C=O de amida, em 1546  $\text{cm}^{-1}$  à vibração de deformação de N-H do grupo amida e 1458 e 1386  $\text{cm}^{-1}$  correspondem às deformações de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, respectivamente. E a banda em 1172  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento C-N dos grupos amidas (WEI *et al.*, 2009; JIJO *et al.*, 2010).

Na Figura 19 estão os espectros dos copolímeros com as regiões 3100 – 2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1600 – 1490  $\text{cm}^{-1}$  ampliadas. Nota-se nos copolímeros sintetizados a 60°C o aparecimento das bandas em 2972 e 1546  $\text{cm}^{-1}$  que são atribuídas ao PNIPAM, isto sugere a ocorrência da enxertia do PNIPAM no sulfato de celulose. Já nas sínteses realizadas à temperatura ambiente os copolímeros não mostraram bandas referentes ao PNIPAM, apenas bandas características de sulfato de celulose. Este fato sugere que a temperatura é um fator importante na enxertia do NIPAM em sulfato de celulose. O aumento na temperatura facilita a iniciação e melhora a difusão do monômero para o local da enxertia (MEENA; BHATTACHARYA, 2015).

Figura 18 - Espectros na região do infravermelho dos copolímeros sintetizados utilizando o iniciador KPS e do homopolímero

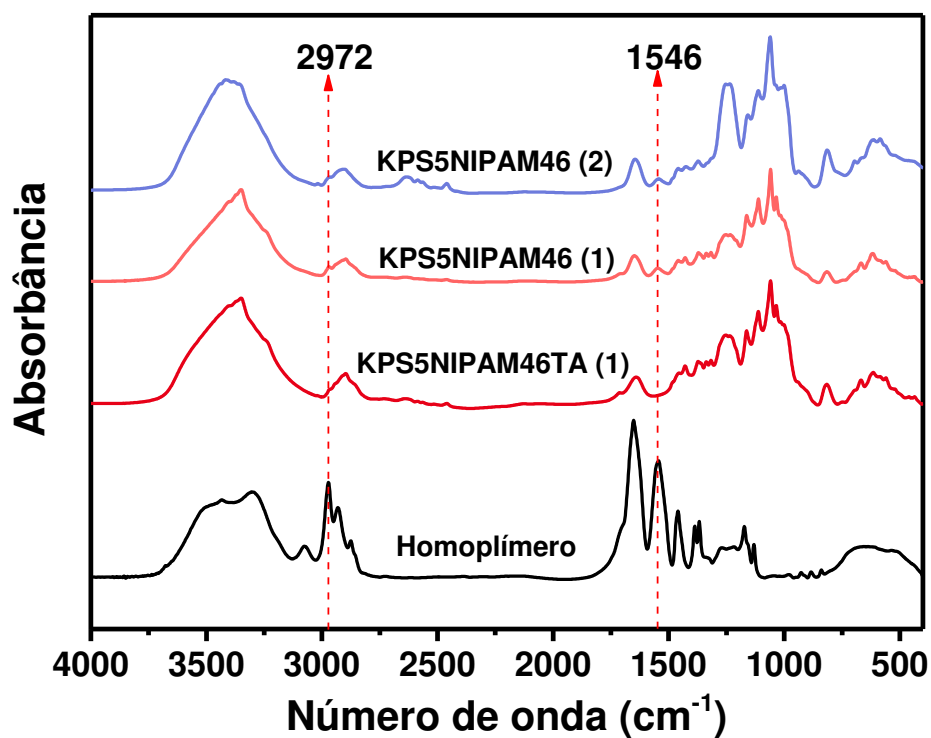
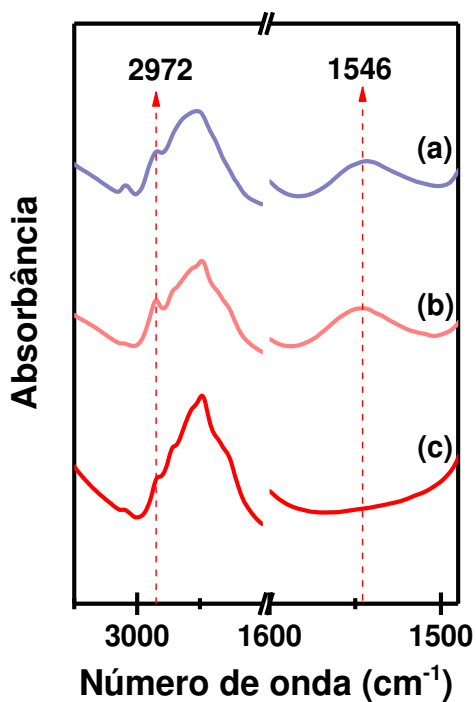


Figura 19 – Espectros dos copolímeros (a) KPS5NIPAM46 (2), (b) KPS5NIPAM46 (1) e (c) KPS5NIPAM46TA (1), com ampliações das regiões 3100 – 2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1600 – 1490  $\text{cm}^{-1}$



A Tabela 9 mostra as razões entre as áreas das bandas 1546 (devido ao PNIPAM) e 1048  $\text{cm}^{-1}$  (devido à celulose) ( $A_{1546}/A_{1048}$ ) para os copolímeros KPS5NIPAM46 (1) e

KPS5NIPAM46 (2) a fim de comparar o processo de enxertia em diferentes graus de sulfatação da celulose.

Tabela 9 - Razão entre as áreas das bandas 1546 e 1048  $\text{cm}^{-1}$  para os copolímeros sintetizados a 60°C com o iniciador KPS

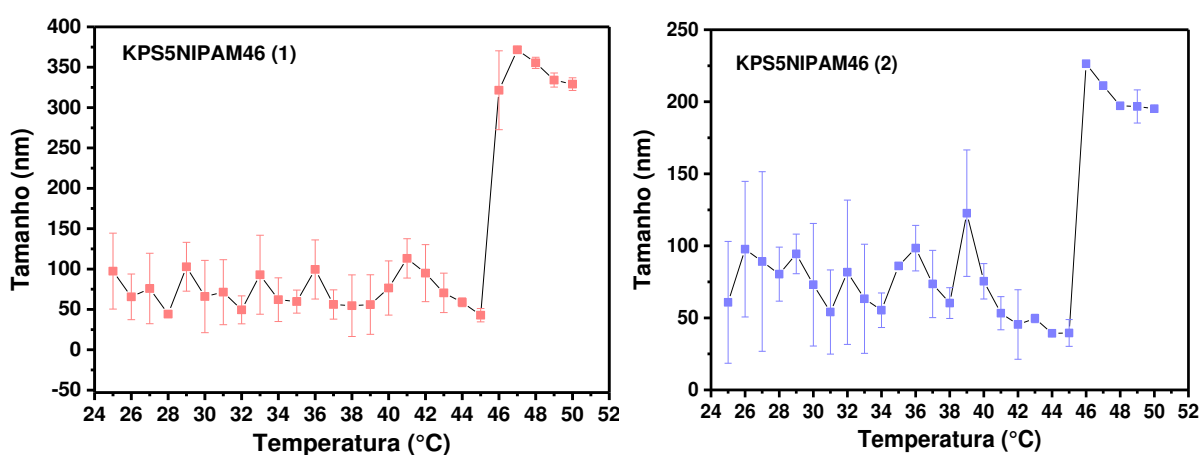
Copolímeros	A <sub>1546</sub> /A <sub>1048</sub>
KPS5NIPAM46 (1)	0,027
KPS5NIPAM46 (2)	0,015

Ao variar o grau de sulfatação e manter a temperatura de síntese (60°C) e a quantidade de SCB e NIPAM constantes, observou-se que a razão entre as bandas  $A_{1546}/A_{1048}$  foi maior para o copolímero sintetizado a partir do derivado com menor GS, SCB 1,2 (GS 0,80).

### 5.3.3 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

A Figura 20 mostra a variação do tamanho com o aumento da temperatura, para os copolímeros KPS5NIPAM46 (1) e KPS5NIPAM46 (2). Observa-se uma variação no tamanho das partículas com o aumento da temperatura e esta variação indica que os copolímeros são termossensíveis.

Figura 20 - Relação do tamanho de partícula com a temperatura para os copolímeros sintetizados utilizando o iniciador KPS



Houve um aumento brusco do tamanho para ambos os copolímeros a 46 °C. Esta temperatura em que ocorre a variação dos tamanhos das partículas é denominada temperatura de transição (LCST) e a partir dela as cadeias de PNIPAM são desidratadas e as interações entre

as próprias cadeias de PNIPAM passam a prevalecer, tendo como consequência a formação de nanopartículas.

A temperatura de transição (LCST) é controlada pelo balanço entre os segmentos hidrofílicos/hidrofóbicos, quanto maior a proporção de PNIPAM no copolímero maior o número de interações hidrofóbicas entre as cadeias, o que leva a uma menor LCST (ALMEIDA *et al.*, 2012). O copolímero KPS5NIPAM46 (1), a partir das análises das áreas bandas  $A_{1546}/A_{1048}$ , foi o que apresentou maior razão, indicando um maior grau de enxertia. A partir desta observação era esperado que o KPS5NIPAM46 (1) apresentasse LCST menor que o KPS5NIPAM46 (2), porém ambos apresentaram mesma temperatura de transição.

O fato de os copolímeros terem apresentado LCST maior que a do PNIPAM (32 °C) deve-se ao aumento do caráter hidrofílico devido ao sulfato de celulose. O reforço das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e o sulfato de celulose levou ao aumento da temperatura de transição (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Os valores dos tamanhos e o índice de polidispersão (IPD) para todos os copolímeros a temperatura de 25 e 50 °C estão mostrados na Tabela 10. Os copolímeros em meio aquoso apresentaram tamanhos na escala nanométrica. Os índices de polidispersão mostraram-se elevados à temperatura de 25 °C e com o aumento da temperatura ocorreu uma redução, sugerindo sistema com distribuição de tamanhos homogêneos. O tamanho das nanopartículas para o copolímero sintetizado com a celulose mais sulfatada (KPS5NIPAM46 (2)) é menor do que aqueles com grau de sulfatação menor, em ambas as temperaturas. Isto pode ser devido ao menor percentual de enxertia do PNIPAM do copolímero KPS5NIPAM46 (1) (Tabela 9).

Tabela 10 - Valores dos tamanhos e IPD para os copolímeros, a 25 e 50 °C

Copolímeros	Tamanho (nm)		IPD	
	25 °C	50 °C	25 °C	50 °C
<b>KPS5NIPAM46 (1)</b>	97,4 ± 47,0	329,0 ± 7,80	0,54 ± 0,11	0,078 ± 0,07
<b>KPS5NIPAM46 (2)</b>	60,8 ± 42,3	195,2 ± 0,10	0,44 ± 0,00	0,280 ± 0,02

Vasile e Nita (2011), ao sintetizarem copolímeros de alginato com PNIPAM, observaram que o baixo percentual de PNIPAM induz o aumento do tamanho das partículas com o aquecimento, e por consequência um aumento da temperatura de transição.

Para fins de uso como sistemas de liberação de fármacos o ideal é que a LCST dos copolímeros seja próxima à temperatura do corpo humano, como os copolímeros sintetizados apresentaram LCST muito elevada estes não se mostraram promissores para esta finalidade.

#### **5.4 Síntese e caracterização dos copolímeros utilizando o iniciador nitrato de amônio cérico IV (CAN)**

##### **5.4.1 Síntese dos copolímeros**

As reações foram realizadas em meio ácido (HNO<sub>3</sub>) com a concentração de ácido de  $5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Em meio aquoso, o CAN existe como Ce<sup>4+</sup>, [Ce(OH)]<sup>3+</sup> e [Ce-O-Ce]<sup>6+</sup> (Equações 5 e 6) e o íon [Ce-O-Ce]<sup>6+</sup> por ser grande não consegue formar complexos com a cadeia principal dos polímeros. Ao acidificar o meio com ácido nítrico o equilíbrio é deslocado para a formação de íons Ce<sup>4+</sup> e por consequência a enxertia é favorecida (GOYAL *et al.*, 2008).

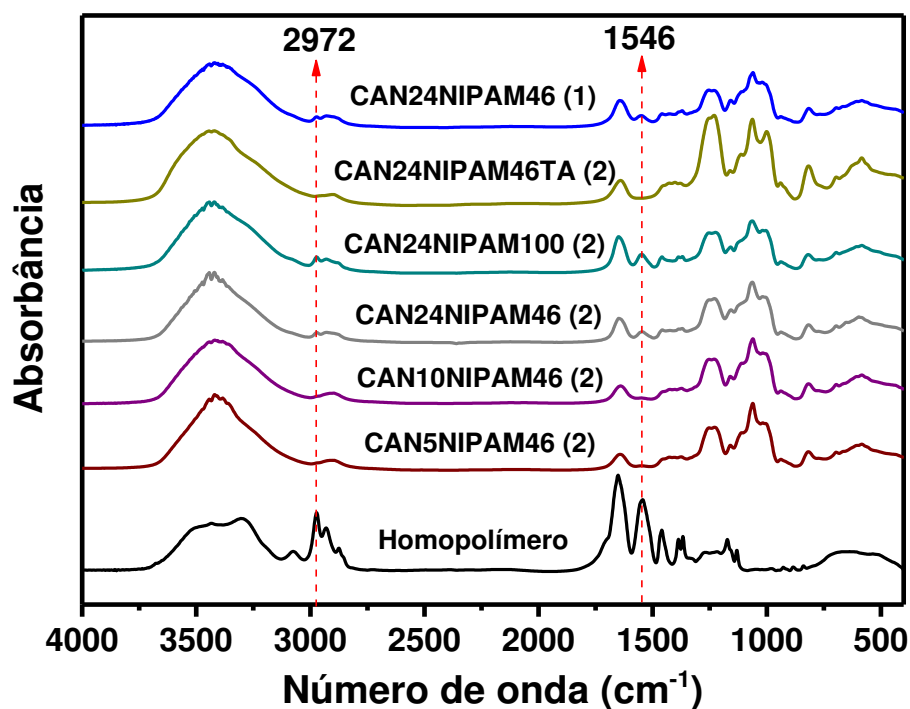


A adição do iniciador a solução de sulfato de celulose faz com que uma turbidez seja observada, isto pode ser ocasionado pela complexação dos grupos sulfato com os íons Ce<sup>4+</sup>. Apesar do meio heterogêneo a reação foi continuada utilizando diferentes quantidades de iniciador e NIPAM.

##### **5.4.2 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

Na Figura 21, estão mostrados os espectros dos copolímeros sintetizados e do homopolímero removido no processo de purificação dos copolímeros. Foi observado que o homopolímero apresentou bandas características de poli N-isopropilacrilamida (3447, 3300, 2972, 1651, 1546 e 1458 cm<sup>-1</sup>). As suas atribuições encontram-se na seção 5.3.2 (p. 47).

Figura 21 - Espectros na região do infravermelho dos copolímeros sintetizados utilizando o iniciador CAN e do homopolímero



Os copolímeros sintetizados com CAN à temperatura ambiente e a 60°C apresentaram a mesma tendência que os sintetizados com o iniciador KPS. Na Figura 22 encontram-se os espectros dos copolímeros com ampliações das regiões 3100 – 2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1600 – 1490  $\text{cm}^{-1}$ , e pode-se observar que as bandas características de PNIPAM (2972 e 1546  $\text{cm}^{-1}$ ) apareceram apenas nos espectros dos copolímeros sintetizados a 60 °C, sendo os copolímeros sintetizados com menor quantidade de iniciador mostram estas bandas bem menos intensas que os demais. Chegando-se a mesma conclusão de que a temperatura é um fator necessário para a enxertia do PNIPAM em sulfato de celulose.

Para avaliar como a variação do grau de sulfatação do derivado, a quantidade de iniciador CAN e de monômero NIPAM influenciaram na reação de enxertia, também se calculou a razão das áreas entre as bandas 1546  $\text{cm}^{-1}$  (devido a PNIPAM) e 1048  $\text{cm}^{-1}$  (devido ao polissacarídeo) ( $A_{1546}/A_{1048}$ ) para os copolímeros sintetizados a 60 °C (CAN5NIPAM46 (2), CAN10NIPAM46 (2), CAN24NIPAM46 (2), CAN24NIPAM100 (2)) (Tabela 11).



Figura 22 – Espectros dos copolímeros (a) CAN24NIPAM46 (1), (b) CAN24NIPAM46TA (2), (c) CAN24NIPAM100 (2), (d) CAN24NIPAM46 (2), (e) CAN10NIPAM46 (2) e (f) CAN5NIPAM46 (2), com ampliações das regiões 3100 – 2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1600 – 1490  $\text{cm}^{-1}$

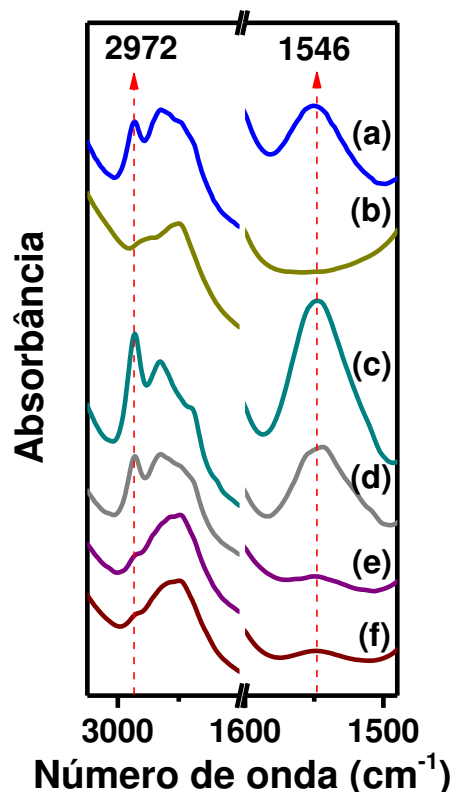


Tabela 11 - Razão entre as áreas das bandas 1546 e 1048  $\text{cm}^{-1}$  para os copolímeros sintetizados a 60°C com o iniciador CAN

Copolímeros	$A_{1546}/A_{1048}$
CAN5NIPAM46 (2)	0,003
CAN10NIPAM46 (2)	0,003
CAN24NIPAM46 (2)	0,048
CAN24NIPAM100 (2)	0,114
CAN24NIPAM46 (1)	0,036

Foi observado que ao aumentar a quantidade de iniciador CAN (de 5 para 24 mg) ocorreu um aumento da razão  $A_{1546}/A_{1048}$  de aproximadamente 16 vezes. E ao aumentar a quantidade de monômero NIPAM (de 46 para 100), a razão entre as bandas também aumentou,

sendo um aumento de aproximadamente 2,4 vezes. Isto mostra que esses dois fatores influenciam no aumento da enxertia de PNIPAM no sulfato de celulose.

Ao manter a quantidade de iniciador CAN e monômero constantes, e variar o grau de sulfatação do derivado sulfatado foi observada uma razão  $A_{1546} / A_{1048}$  maior para o copolímero CAN24NIPAM46 (2) cuja síntese foi realizada com o derivado mais sulfatado. Porém, a diferença entre as razões das áreas não foi tão elevada quanto ao variar a quantidade de iniciador e monômero. Para os copolímeros sintetizados com o iniciador KPS foi observada uma tendência contrária.

Os copolímeros preparados com a maior quantidade de CAN apresentaram rendimentos de  $38,6 \pm 4,8$ ;  $22,4 \pm 1,9$  e  $12,8 \pm 4,5\%$ , respectivamente para os copolímeros CAN24NIPAM46 (2), CAN24NIPAM100 (2) e CAN24NIPAM46 (1). Os rendimentos obtidos foram baixos, e observa-se que ao aumentar a quantidade de NIPAM o rendimento reduziu, provavelmente devido à formação de homopolímero com o excesso de NIPAM. Abreu et al. (2016) ao estudar a enxertia de PNIPAM em goma do cajueiro também observou uma redução do rendimento ao aumentar a quantidade de NIPAM e este fato foi justificado pelo favorecimento da reação de homopolimerização.

#### 5.4.3 Ressonância Magnética Nuclear de próton (RMN $^1H$ )

A estrutura química dos copolímeros CAN24NIPAM46 (2) e CAN24NIPAM100 (2) também foi avaliada por RMN  $^1H$  (Figura 23).

Observam-se sinais característicos de anéis de glicose não sulfatados (4,58; 3,53; 3,67; 3,70; 3,36; 3,84-3,98 ppm referentes aos prótons H-1 a H-6, respectivamente), sinais de anéis de glicose sulfatados (sinais em 4,13; 4,35-4,4 ppm devidos aos hidrogênios H-2 e H-6 de carbonos sulfatados) (Figura 24) e sinais atribuídos ao PNIPAM. De acordo com a literatura os deslocamentos químicos (ppm) correspondentes ao PNIPAM são: 3,9 (- $\underline{CH}$ (CH $_3$ ) $_2$ ), 2,0 (-CH- $\underline{CH}_2$ ), 1,60 (- $\underline{CH}$ -CH $_2$ ) e 1,1 (-CH( $\underline{CH}_3$ ) $_2$ ) (WANG *et al.*, 2002). E os quatro sinais podem ser observados nos espectros, confirmando assim a reação de enxertia. Os sinais citados estão representados pelas letras b, d, c, a, respectivamente, na estrutura do PNIPAM na Figura 23.

Figura 23 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos copolímeros CAN24NIPAM46 (2) e CAN24NIPAM100(2) a 25°C

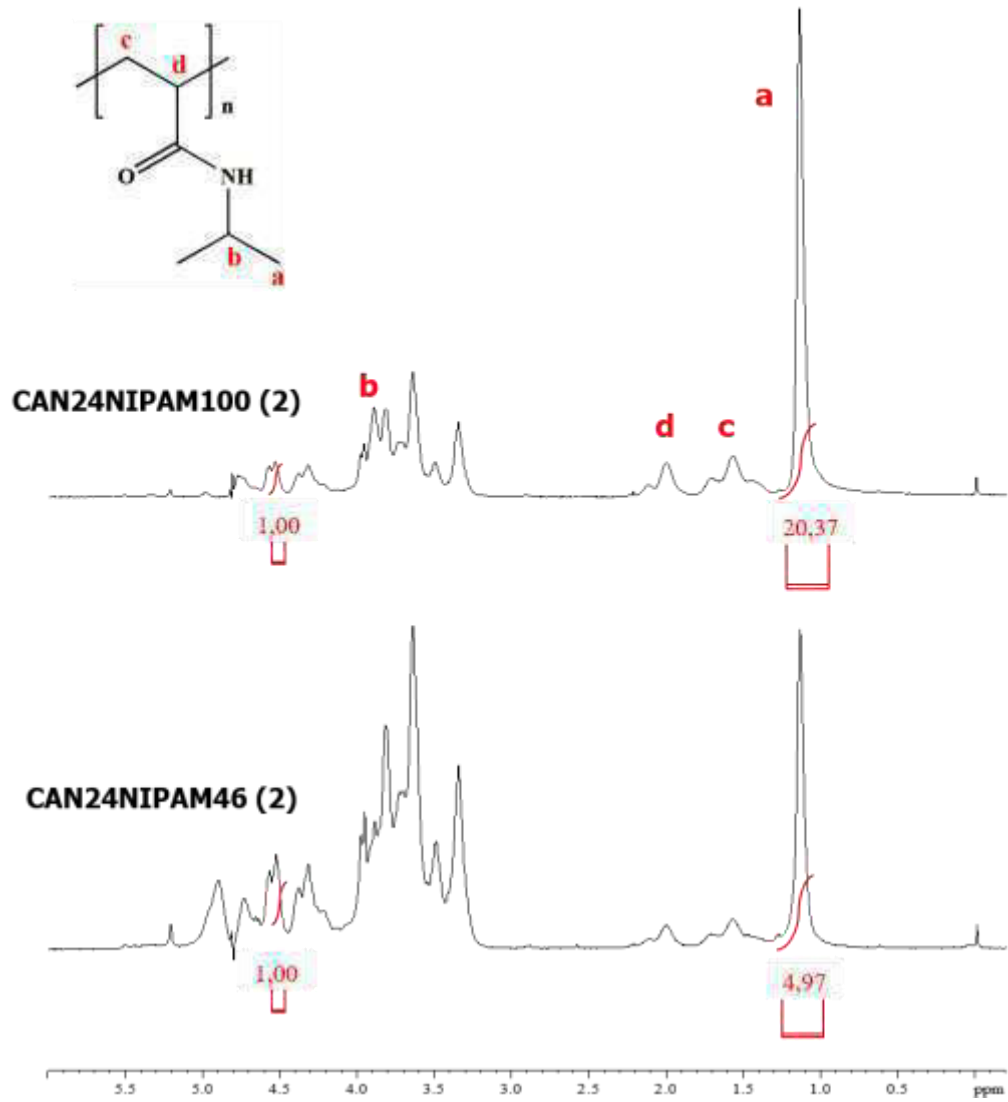
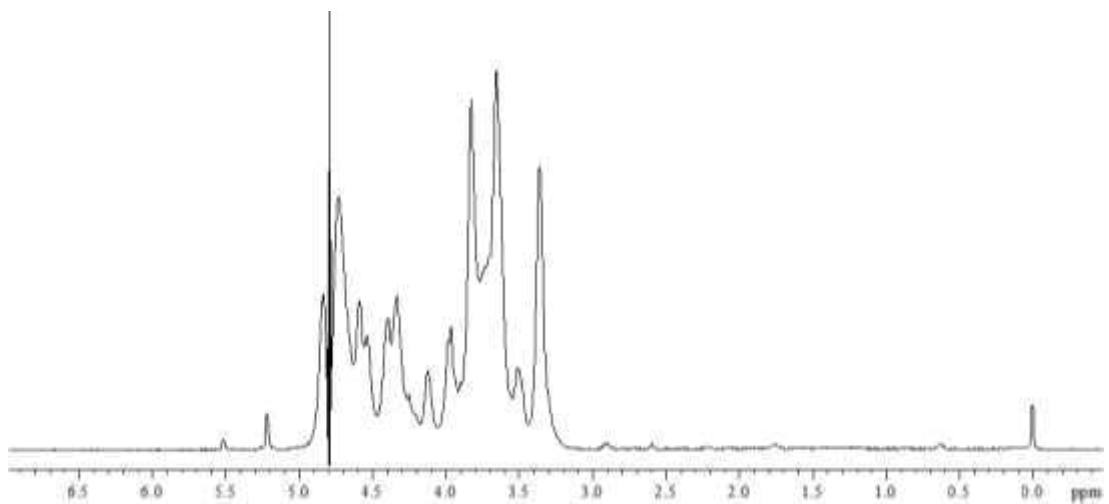


Figura 24 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  para o derivado sulfatado SCB2



A substituição molar (SM), ou seja, a quantidade de PNIPAM por unidade glicosídica, foi determinada a partir da razão das áreas do sinal correspondente aos prótons do grupo isopropil ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ) do PNIPAM em 1,1 ppm (P) e do sinal relativo ao carbono anomérico do SCB em 4,58 ppm (A) (Equação 5).

$$SM = \frac{P/6}{A} \quad (5)$$

O valor da substituição molar para os copolímeros CAN24NIPAM46 (2) e CAN24NIPAM100 (2) foram 0,83 e 3,40, respectivamente. A quantidade de PNIPAM inserida na cadeia de sulfato de celulose foi maior para o copolímero CAN24NIPAM100 (2), o que também foi confirmado por FTIR.

#### 5.4.4 Concentração de associação crítica (CAC)

A concentração de associação crítica é a concentração mínima de copolímeros necessária para a formação das nanopartículas. A fim de encontrar os valores de CAC dos copolímeros CAN24NIPAM46 (2) e CAN24NIPAM100 (2) utilizou a técnica espectrofluorimetria, aplicando o pireno como sonda fluorescente. As bandas de fluorescência do pireno são sensíveis à polaridade do microambiente onde este se encontra (KALYANASUNDARAM; THOMAS, 1977). Com isso, variações nas razões entre as bandas em 338 e 334 nm ( $I_{338} / I_{334}$ ) do espectro de excitação do pireno podem indicar a polaridade do meio que rodeia o pireno, sendo apresentados valores baixos em ambientes polares e valores altos em meios hidrofóbicos (WILHELM *et al.*, 1991).

Nas Figuras 25 e 26, pode-se observar as razões  $I_{338} / I_{334}$  versus as concentrações dos copolímeros. Em baixas concentrações ambos os copolímeros apresentaram baixos valores de  $I_{338} / I_{334}$ , indicando que o pireno está disperso no meio aquoso. Ao aumentar a concentração dos copolímeros foi observado um aumento da razão das bandas em estudo e isto é um indicativo de que o pireno encontra-se em um meio apolar, relativo ao interior das nanopartículas que se formaram e têm os segmentos hidrofóbicos de PNIPAM voltados para o seu interior.

Figura 25 - Razões  $I_{338}/I_{334}$  em função das concentrações do copolímero CAN24NIPAM46 (2) a 25 e 50 °C

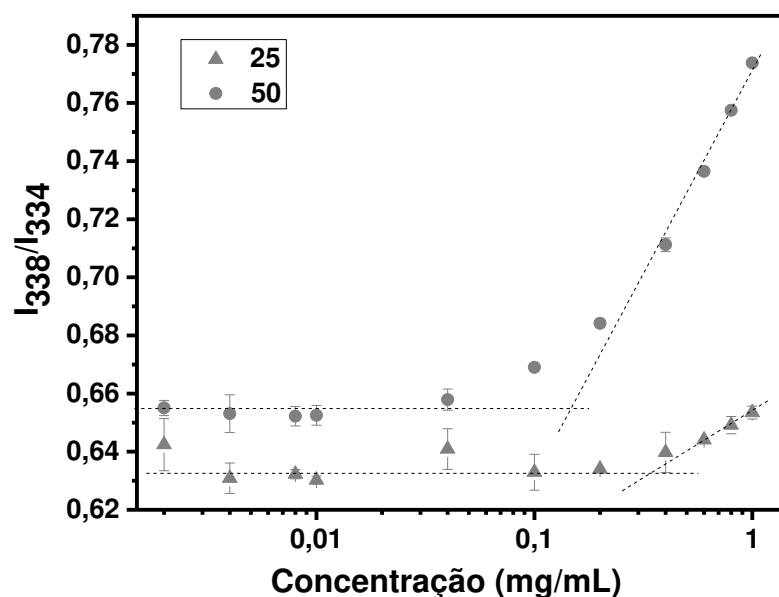
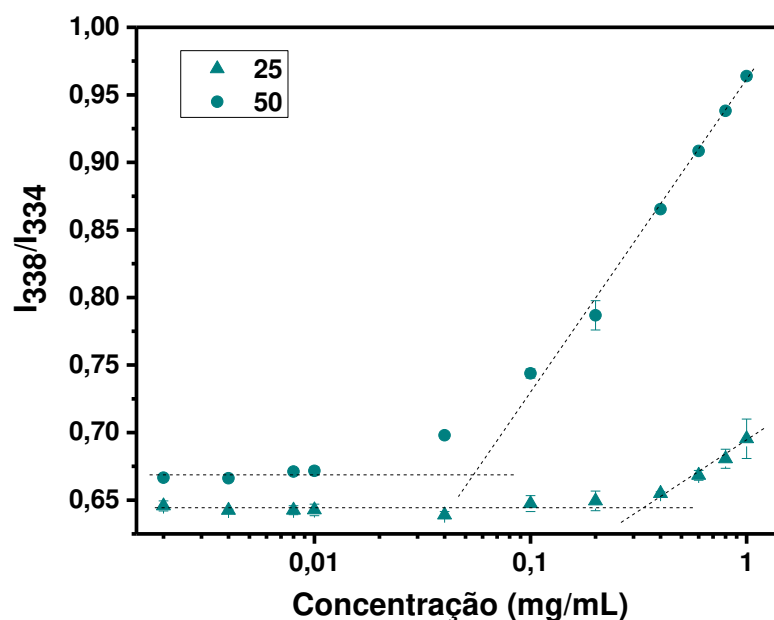


Figura 26 - Razões  $I_{338}/I_{334}$  em função das concentrações do copolímero CAN24NIPAM100 (2) a 25 e 50 °C



Os valores de CAC foram determinados pela interseção entre as retas antes e após o ponto de inflexão e os valores estão mostrados na Tabela 12. Para ambos os copolímeros os valores de CAC a 25 °C (0,34 e 0,33 mg/ml) foram maiores que a 50 °C (0,16 e 0,05 mg/ml), indicando que acima da temperatura de transição (LCST) são necessárias concentrações de copolímeros mais baixas para a formação das nanopartículas.

Tabela 12 - Valores de concentração de associação crítica para os copolímeros CAN24NIPAM46 (2) e CAN24NIPAM100 (2)

Copolímeros	CAC (mg/ml) (25 °C)	CAC (mg/ml) (50 °C)
<b>CAN24NIPAM46 (2)</b>	0,34	0,16
<b>CAN24NIPAM100 (2)</b>	0,33	0,05

Os valores de CAC a 25 °C foram muito próximos para os dois copolímeros, enquanto que a 50 °C o copolímero CAN24NIPAM100 (2) apresentou um valor três vezes menor que o do copolímero CAN24NIPAM46 (2). Isto pode ser atribuído ao fato de que o CAN24NIPAM100 (2) apresenta um maior caráter hidrofóbico, por possuir um maior percentual de PNIPAM, e com isso as nanopartículas são formadas em concentração menores.

Patrizi *et al.*, (2009) sintetizaram copolímeros de dextrana enxertados com PNIPAM e observaram uma redução da CAC com o aumento do grau de enxertia de PNIPAM nos copolímeros (0,096 – 0,031 mg/mL).

#### 5.4.5 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

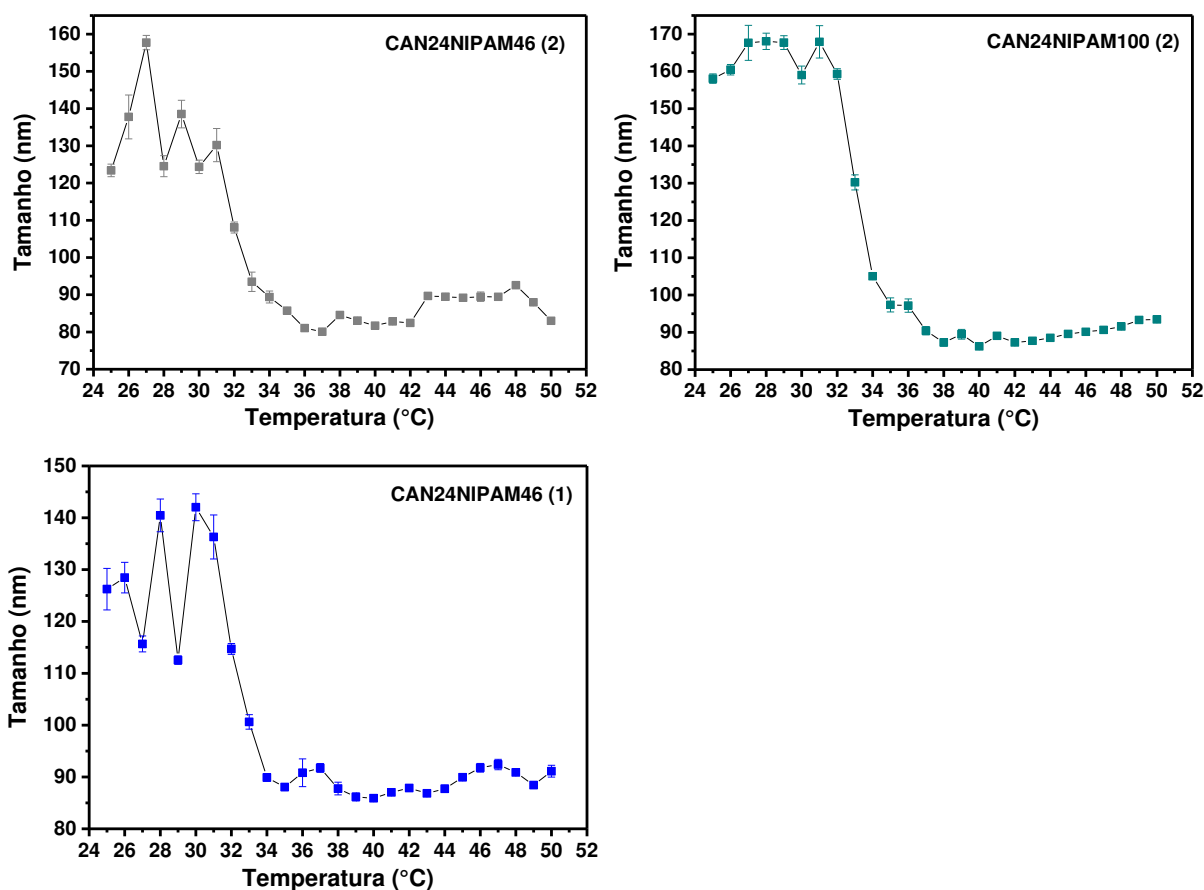
Os copolímeros eram solúveis em água à temperatura ambiente devido aos segmentos hidrofílicos do sulfato de celulose e do PNIPAM. Porém, com o aumento da temperatura a solução tornou-se turva, indicando uma característica termossensível dos copolímeros e a auto-organização destes em nanopartículas. Sabe-se que partir da LCST as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e os grupos amida do PNIPAM são desfeitas, ocorrendo o favorecimento das interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais do copolímero e conseqüente formação das nanopartículas com o PNIPAM no núcleo (ALMEIDA *et al.*, 2012).

A variação do tamanho com o aumento da temperatura, para os copolímeros sintetizados a 60 °C está mostrada na Figura 27. Observa-se que com o aumento da temperatura houve uma redução do tamanho das partículas e esta variação nos tamanhos confirma a termossensibilidade dos copolímeros. A LCST para os copolímeros foram em torno de 33 °C para o CAN24NIPAM46 (2) e 34 °C para o CAN24NIPAM100 (2) e o CAN24NIPAM46 (1).

O comportamento observado na síntese dos copolímeros com CAN é diferente do mostrado na Figura 20 para os copolímeros sintetizados utilizando KPS. Vasile e Nita (2011) sugerem para copolímeros de alginato com PNIPAM que a diferença de comportamento se deve

ao percentual de PNIPAM no copolímero. Copolímeros com baixo percentual de PNIPAM tendem a ter o tamanho de partículas aumentado com o aquecimento. Enquanto que os copolímeros com alto percentual de PNIPAM têm o tamanho das partículas reduzido com o aumento da temperatura.

Figura 27 - Relação do tamanho de partícula com a temperatura para os copolímeros CAN24NIPAM46 (2), CAN24NIPAM100 (2) e CAN24NIPAM46 (1)



Se comparados os dados das Tabelas 9 e 11, observa-se que a razão entre as absorvâncias devido ao PNIPAM ( $A_{1546}$ ) e a absorvância da ligação C-O-C do polissacarídeo ( $A_{1048}$ ) são maiores para os copolímeros sintetizados com CAN indicando um maior percentual de PNIPAM o que acarreta o decréscimo do tamanho das nanopartículas com o aumento da temperatura, o que condiz com o proposto por Vasile e Nita (2011). Este mesmo comportamento foi também observado em copolímeros de quitosana enxertada com PNIPAM (LI *et al.*, 2013) e copolímeros de poli (óxido de etileno) enxertado com PNIPAM (WANG *et al.*, 2013).

A LCST do PNIPAM é 32 °C e os copolímeros apresentaram temperatura de transição maior, o que sugere o aumento do caráter hidrofílico devido ao sulfato de celulose.

Com a enxertia do PNIPAM em SCB, as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e copolímero foram reforçadas levando ao aumento da temperatura de transição (ALMEIDA *et al.*, 2012).

As nanopartículas formadas para todos os copolímeros mostrados na Figura 24 apresentaram tamanhos na escala nanométrica e os sistemas mostraram-se menos polidispersos com o aumento da temperatura. Os valores dos tamanhos e o índice de polidispersão (IPD) para todos os copolímeros a temperatura de 25 e 50 °C estão mostrados na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores dos tamanhos e IPD para os copolímeros, a 25 e 50 °C

Copolímeros	Tamanho (nm)		IPD	
	25 °C	50 °C	25 °C	50 °C
<b>CAN24NIPAM46 (2)</b>	123,4 ± 1,7	83,01 ± 0,8	0,346 ± 0,05	0,211 ± 0,01
<b>CAN24NIPAM100 (2)</b>	158,1 ± 0,3	93,44 ± 0,6	0,261 ± 0,01	0,245 ± 0,01
<b>CAN24NIPAM46 (1)</b>	126,2 ± 4,0	91,11 ± 1,1	0,435 ± 0,02	0,189 ± 0,00

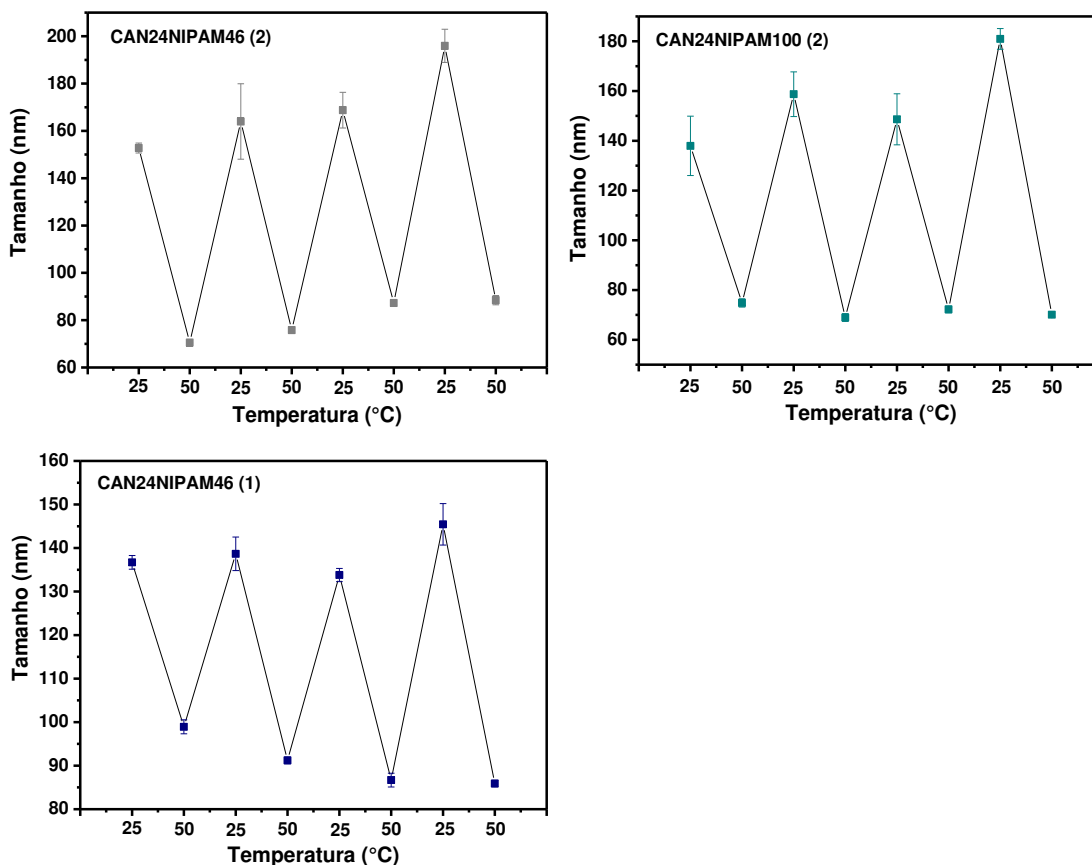
Após a temperatura de transição de fase, o índice de polidispersão reduziu indicando a formação de sistemas com distribuição de tamanhos mais homogêneos. Esse fato sugere que os copolímeros se auto-organizaram formando nanopartículas. Os tamanhos das nanopartículas a 50°C foram todos menores que 100 nm e são menores dos que os valores reportados para copolímeros de PNIPAM com goma do cajueiro (ABREU *et al.* 2016), carragenana (GAWEL *et al.*, 2013), quitosana (LI *et al.*, 2013) e alginato (VASILE *et al.*, 2016), mas são similares aos obtidos para quitosana carboximetilada com diferentes graus de carboximetilação (CHEN *et al.* 2010) (Tabela 1).

O aumento do percentual de PNIPAM (CAN24NIPAM100 (2)) provoca um aumento no tamanho das nanopartículas, provavelmente devido às cadeias maiores de PNIPAM neste copolímero. A variação no grau de sulfatação não apresentou variação no tamanho a 25 °C, entretanto a amostra menos sulfatada (CAN24NIPAM46 (1)) apresentou maior tamanho a 50 °C.

Através da Figura 28, observa-se que a formação das nanopartículas mostrou-se reversível com sucessivos ciclos de aquecimento e resfriamento (25 e 50 °C) dos copolímeros. E a tendência da redução do tamanho com o aquecimento continuou sendo observada.



Figura 28 – Ciclos de aquecimento e resfriamento (25 e 50 °C) dos copolímeros



O fato de as nanopartículas terem apresentado tamanhos menores que 100 nm as tornam promissoras no uso como sistemas para carreamento e liberação de fármacos. No caso do tratamento de câncer, uma vez que os vasos sanguíneos dos tecidos tumorais apresentam maior permeabilidade e retenção devido ao aumento do número e tamanho dos poros (50 a 100 nm), nanopartículas com tamanhos de 10 a 200 nm podem passar maior tempo retidas nos tecidos e seus tamanhos podem ter a função de direcioná-las para os tecidos tumorais (STEICHEN *et al.*, 2013; PARVANIAN *et al.*, 2017).

## 6 CONCLUSÕES

Sulfato de celulose bacteriana (SCB) em diferentes graus de substituição (GS 0,80 e 1,56) foram obtidos e caracterizados. O rendimento reacional e o grau de sulfatação aumentaram ao elevar a quantidade de reagente sulfatante. Os derivados sulfatados tiveram uma redução no grau de cristalinidade e a sulfatação ocorreu preferencialmente no carbono C-6 da celulose.

Copolímeros foram sintetizados utilizando iniciadores radicalares (KPS e CAN) e ambos apresentaram termossensibilidade. A temperatura, a quantidade de iniciador e de NIPAM mostram-se fatores necessários para o aumento da enxertia de PNIPAM em sulfato de celulose bacteriana.

O grau de inserção das cadeias de PNIPAM na síntese com KPS foi menor que na síntese utilizando CAN. Os copolímeros KPS5NIPAM46 (1) e KPS5NIPAM46 (2) mostraram comportamento característico de copolímeros com baixo percentual de PNIPAM, com temperatura de transição (LCST) elevada (46 °C). Já os copolímeros CAN24NIPAM46 (2), CAN24NIPAM100 (2) e CAN24NIPAM46 (1) apresentaram um comportamento contrário, com LCST variando de 33-34 °C.

A concentração de associação crítica dos copolímeros CAN24NIPAM46 (2) e CAN24NIPAM100 (2) acima da LCST mostrou-se dependente do percentual de PNIPAM enxertado. As nanopartículas preparadas a partir dos copolímeros CAN24NIPAM46 (2), CAN24NIPAM100 (2) e CAN24NIPAM46 (1) apresentaram tamanhos inferiores a 100 nm, após a LCST, indicando que as sínteses utilizando o iniciador CAN levaram a materiais promissores para o uso como sistemas de liberação de fármacos.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, C. M. W. S.; PAULA, H. C. B.; SEABRA, V.; *et al.* Synthesis and characterization of non-toxic and thermo-sensitive poly(N-isopropylacrylamide)-grafted cashew gum nanoparticles as a potential epirubicin delivery matrix. **Carbohydrate Polymers**, v. 154, p. 77–85, 2016.
- AGUILAR, M. R.; ROMÁN, J. S. Introduction to smart polymers and their applications. In: M. R. Aguilar; J. S. Román; **Smart Polymers and their Applications**. 1 ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014. 568 p.
- ALEXANDRIDIS, P. Amphiphilic copolymers and their applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 1, p. 490–501, 1996.
- ALMEIDA, H.; AMARAL, M. H.; LOBÃO, P. Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and selfregulated drug delivery. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, p. 01-10, 2012.
- AZEREDO, H. M. C.; ROSA, M. F.; MATTOSO, L. H. C. Nanocellulose in bio-based food packaging applications. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 664–671, 2017.
- BAJPAI, A.; SIMON, J.; TIWARI, S.; DIXIT, N. Macroredox Polymerization of Styrene on the Hydrophobic Substrate, Hydroxy-Terminated Polybutadiene Using V(V) as an Oxidant. **Journal of Macromolecular Science Part A - Pure and Applied Chemistry**, v. A41, p. 669–684, 2004.
- BAUMANN, H.; RICHTER, A.; KLEMM, D.; FAUST, V. Concepts for preparation of novel regioselective modified cellulose derivatives sulfated, aminated, carboxylated and acetylated for hemocompatible ultrathin coatings on biomaterials. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 201, p. 1950–1962, 2000.
- BAYRAMGIL, N. P. Preparation of Graft Copolymers of Cellulose Derivatives and Their Use in Recovery Processes. In: V. K. Thakur; **Cellulose-Based Graft Copolymers Structure and Chemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2015. 597 p.
- BHATTACHARYA, A.; MISRA, B. N. Grafting: A versatile means to modify polymers: Techniques, factors and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 29, p. 767–814, 2004.

- BORDALLO, E.; RIEUMONT, J.; TIERA, M. J.; GÓMEZ, M.; LAZZARI, M. Self-assembly in aqueous solution of amphiphilic graft copolymers from oxidized carboxymethylcellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 124, p. 43–49, 2015.
- CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Microbial cellulose: Fermentative production and applications ( Review ). **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, p. 107–124, 2009.
- CHEN, G.; ZHANG, B.; ZHAO, J.; CHEN, H. Improved process for the production of cellulose sulfate using sulfuric acid/ethanol solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 332–337, 2013.
- CHEN, S. B.; ZHONG, H.; ZHANG, L. L.; *et al.* Synthesis and characterization of thermoresponsive and biocompatible core-shell microgels based on N-isopropylacrylamide and carboxymethyl chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 747–752, 2010.
- CHEN, X.; HUANG, Y.; ZHANG, H.; GAUTHIER, M.; YANG, G. Intelligent Responsive Copolymers Based on Cellulose Structure, Properties, and Applications. In: V. K. Thakur; **Cellulose-Based Graft Copolymers Structure and Chemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2015. 597 p.
- CHRISTENSEN, N. D.; REED, C. A.; CULP, T. D.; *et al.* Papillomavirus microbicidal activities of high-molecular-weight cellulose sulfate, dextran sulfate, and polystyrene sulfonate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 3427–3432, 2001.
- CHUMACHENKO, V.; KUTSEVOL, N.; HARA HUTS, Y.; *et al.* Star-like dextran-graft-pnlpam copolymers. Effect of internal molecular structure on the phase transition. **Journal of Molecular Liquids**, v. 235, p. 77–82, 2017.
- CONSTANTIN, M.; BUCĂȚARIU, S.; STOICA, I.; FUNDUEANU, G. Smart nanoparticles based on pullulan-g-poly(N-isopropylacrylamide) for controlled delivery of indomethacin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 698–708, 2017.
- CREDOU, J.; BERTHELOT, T. Cellulose: from biocompatible to bioactive material. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, p. 4767–4767, 2014.
- CZAJA, W.; KRYSZYŃOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN, R. M. Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, p. 145–151, 2006.

de PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. A.; PAULA, H. B. Polysaccharide based Copolymers as Supramolecular Systems in Biomedical Applications. **Current Drug Targets**, v. 16, p. 1591–1605, 2015.

DENG, F.; GE, X.; ZHANG, Y.; LI, M. C.; CHO, U. R. Synthesis and characterization of microcrystalline cellulose-graft-poly(methyl methacrylate) copolymers and their application as rubber reinforcements. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, p. 1–10, 2015.

DEPTUŁA, T.; WAROWICKA, A.; WOŹNIAK, A.; *et al.* Cytotoxicity of thermo-responsive polymeric nanoparticles based on N-isopropylacrylamide for potential application as a bioscaffold. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, p. 311–316, 2015.

DIONÍSIO, M.; BRAZ, L.; CORVO, M.; *et al.* Charged pullulan derivatives for the development of nanocarriers by polyelectrolyte complexation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 129–138, 2016.

EL-HAMSHARY, H.; FOUDA, M. M. G.; MOYDEEN, M.; *et al.* Synthesis and antibacterial of carboxymethyl starch-grafted poly(vinyl imidazole) against some plant pathogens. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1466–1472, 2015.

EL-SALAM, S. S. A. Bacterial Cellulose of Kombucha Mushroom Tea. **New York Science Journal**, v. 5, p. 81–87, 2012.

FANG, L.; CATCHMARK, J. M. Characterization of cellulose and other exopolysaccharides produced from *Gluconacetobacter* strains. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 663–669, 2015.

GAWEŁ, K.; KAREWICZ, A.; BIELSKA, D.; *et al.* A thermosensitive carrageenan-based polymer: Synthesis, characterization and interactions with a cationic surfactant. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p. 211–217, 2013.

GERICKE, M.; DOLIŠKA, A.; STANA, J.; *et al.* Semi-Synthetic Polysaccharide Sulfates as Anticoagulant Coatings for PET, 1 - Cellulose Sulfate. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, p. 549–556, 2011.

GOYAL, P.; KUMAR, V.; SHARMA, P. Graft Copolymerization of Acrylamide onto Tamarind Kernel Powder in the Presence of Ceric ion. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 108, p. 3696–3701, 2008.

HOFFMAN, A. S.; STAYTON, P. S.; BULMUS, V.; *et al.* Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, p. 577–586, 2000.

HONG, P.; FA, C.; WEI, Y.; SEN, Z. Surface properties and synthesis of the cellulose-based amphoteric polymeric surfactant. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 625–630, 2007.

HOOGENBOOM, R. Temperature-responsive polymers: properties, synthesis and applications. In: M. R. Aguilar; J. S. Román; **Smart Polymers and their Applications**. 1 ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014. 568 p.

HORIKAWA, M.; FUJIKI, T.; SHIROSAKI, T.; *et al.* The development of a highly conductive PEDOT system by doping with partially crystalline sulfated cellulose and its electric conductivity. **Jornal of Material Chemical C**, v. 3, p. 8881–8887, 2015.

HUANG, Y.; ZHU, C.; YANG, J.; *et al.* Recent advances in bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 21, p. 1–30, 2014.

IFUKU, S.; NOGI, M.; ABE, K.; *et al.* Surface modification of bacterial cellulose nanofibers for property enhancement of optically transparent composites: Dependence on acetyl-group DS. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1973–1978, 2007.

JANKAEW, R.; RODKATE, N.; LAMLERTTHON, S., RUTNAKORNPITUK, B., WICHAI, U.; ROSS, G.; RUTNAKORNPITUK, M. “Smart” carboxymethylchitosan hydrogels crosslinked with poly(N-isopropylacrylamide) and poly(acrylic acid) for controlled drug release. **Polymer Testing**, v. 42, p. 26–36, 2015.

JJO, V. J.; SHARMA, K. P.; MATHEW, R.; *et al.* Volume transition of PNIPAM in a nonionic surfactant hexagonal mesophase. **Macromolecules**, v. 43, p. 4782–4790, 2010.

JONG, W. H. DE; BORM, P. J. A. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, p. 133–149, 2008.

KALAOĞLU, Ö. İ.; ÜNLÜ, C. H.; ATICI, O. G. Synthesis, characterization and electrospinning of corn cob cellulose-graft-polyacrylonitrile and their clay nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 37–44, 2016.

KALIA, S.; SABAA, M. W. **Polysaccharide Based Graft Copolymers**. Heidelberg: Springer, 2013. 553 p.

KALYANASUNDARAM, K.; THOMAS, J. K. Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, p. 2039–2044, 1977.

KASGOZ, H.; OZBAS, Z.; ESEN, E.; SAHIN, C. P.; GURDAG, G. Removal of copper(II) ions with a thermoresponsive cellulose-g-poly(N- isopropyl acrylamide) copolymer. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 130, p. 4440–4448, 2013.

KEKEZ, B.; GOJGIĆ-CVIJOVIĆ, G.; JAKOVLJEVIĆ, D.; *et al.* Synthesis and characterization of a new type of levan-graft-polystyrene copolymer. **Carbohydrate Polymers**, v. 154, p. 20–29, 2016.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.-P.; BOHN, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 44, p. 3358–3393, 2005.

KOCHERBITOV, V.; ULVENLUND, S.; KOBER, M.; JARRING, K.; ARNEBRAN, T. Hydration of microcrystalline cellulose and milled cellulose studied by sorption calorimetry. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, p. 3728–3734, 2008.

LAI, J.-Y.; LUO, L.-J. Chitosan-g-poly(N-isopropylacrylamide) copolymers as delivery carriers for intracameral pilocarpine administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 113, p. 140–148, 2017.

LEE, R.-S.; LIN, C.-H.; ALJUFFALI, I. A.; HU, K.-Y.; FANG, J.-Y. Passive targeting of thermosensitive diblock copolymer micelles to the lungs: synthesis and characterization of poly(N-isopropylacrylamide)-block-poly( $\epsilon$ -caprolactone). **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13, p. 42–53, 2015.

LEVDANSKY, V. A; KONDRACENKO, A. S.; EINSTEIN, A.; CEDEX, F.-V. Sulfation of Microcrystalline Cellulose with Sulfamic Acid in N , N-Dimethylformamide and Diglyme. **Journal of Siberian Federal University**, v. 2, p. 162–169, 2014.

LI, G.; GUO, L.; WEN, Q.; ZHANG, T. Thermo- and pH-sensitive ionic-crosslinked hollow spheres from chitosan-based graft copolymer for 5-fluorouracil release. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 55, p. 69–74, 2013.

LIM, Y. Self-Assembling Peptide Nanostructures: Towards Bioactive Artificial Protein Nanomaterials. In: J. Castillo; L. Sasso; W. E. Svendsen; **Self-assembled peptide nanostructures : advances and applications in nanobiotechnology**. Boca Raton: CRC Press, 2012. 324 p.

LIU, S.; SUN, G. Radical graft functional modification of cellulose with allyl monomers: Chemistry and structure characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 614–625, 2008.

LUO, Z.; YAN, Z.; JIN, K.; *et al.* Precise glioblastoma targeting by AS1411 aptamer-functionalized poly (L- $\gamma$ -glutamylglutamine)–paclitaxel nanoconjugates. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 490, p. 783–796, 2017.

MAATAR, W.; BOUFI, S. Poly(methacrylic acid-co-maleic acid) grafted nanofibrillated cellulose as a reusable novel heavy metal ions adsorbent. **Carbohydrate Polymers**, v. 126, p. 199–207, 2015.

MAEHARA, T.; ICHINOSE, H.; FURUKAWA, T.; *et al.* Ethanol production from high cellulose concentration by the basidiomycete fungus *Flammulina velutipes*. **Fungal Biology**, v. 117, p. 220–226, 2013.

MAHANTA, A. K.; MITTAL, V.; SINGH, N.; *et al.* Polyurethane-grafted chitosan as new biomaterials for controlled drug delivery. **Macromolecules**, v. 48, p. 2654–2666, 2015.

MAHARANA, T.; PATTANAIK, S.; ROUTARAY, A.; NATH, N.; SUTAR, A. K. Synthesis and characterization of poly(lactic acid) based graft copolymers. **Reactive and Functional Polymers**, v. 93, p. 47–67, 2015.

MALONNE, H.; EECKMAN, F.; FONTAINE, D.; *et al.* Preparation of poly(N-isopropylacrylamide) copolymers and preliminary assessment of their acute and subacute toxicity in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 61, p. 188–194, 2015.

MARQUES, N. N.; LIMA, B. V.; SILVEIRA, V. R.; *et al.* PNIPAM-based graft copolymers prepared using potassium persulfate as free-radical initiator: synthesis reproducibility. **Colloid and Polymer Science**, v. 294, p. 981–991, 2016.



- MEENA, R.; BHATTACHARYA, A. Grafting on Cellulosics Progress toward Purpose. In: V. K. Thakur; **Cellulose-Based Graft Copolymers Structure and Chemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2015 597 p.
- MELLATI, A.; KIAMAHALLEH, M. V.; DAI, S.; *et al.* Influence of polymer molecular weight on the in vitro cytotoxicity of poly (N-isopropylacrylamide). **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 509–513, 2016.
- MIHRANYAN, A. Cellulose from cladophorales green algae: From environmental problem to high-tech composite materials. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, p. 2449–2460, 2011.
- MISHRA, M. K.; TRIPATHY, A. K.; LENKA, S.; NAYAK, P. L. Grafting Vinyl Monomers onto Cellulose. V. Graft Copolymerization of Methyl Methacrylate onto Cellulose Using a Hexavalent Chromium Ion. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 26, p. 2769–2771, 1981.
- MOAD, G.; SOLOMON, D. H. **The chemistry of radical polymerization**. 2 ed. Oxford: Elsevier, 2005. 665 p.
- MOHANAN, A.; VISHALAKSHI, B.; GANESH, S. Swelling and diffusion characteristics of stimuli-responsive N-isopropylacrylamide and k-carrageenan semi-IPN hydrogels. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 60, p. 787–798, 2011.
- MORELLI, A.; BETTI, M.; PUPPI, D.; CHIELLINI, F. Design, preparation and characterization of ulvan based thermosensitive hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 1108–1117, 2016.
- MOURA NETO, É. DE; S. MACIEL, J. DA; CUNHA, P. L. R.; de PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Preparation and characterization of a chemically sulfated cashew gum polysaccharide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1953–1960, 2011.
- MOURA NETO, E.; SOMBRA, V. G.; RICHTER, A. R.; *et al.* Chemically sulfated galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* seed: Characterization and toxicity evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1013–1017, 2014

MUHITDINOV, B.; HEINZE, T.; NORMAKHAMATOV, N.; TURAEV, A. Preparation of sodium cellulose sulfate oligomers by free-radical depolymerization. **Carbohydrate Polymers**, v. 173, p. 631–637, 2017.

MUNDARGI, R. C.; PATIL, S. A.; AMINABHAVI, T. M. Evaluation of acrylamide-grafted-xanthan gum copolymer matrix tablets for oral controlled delivery of antihypertensive drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 130–141, 2007.

NAHA, P. C.; BHATTACHARYA, K.; TENUTA, T.; *et al.* Intracellular localisation, geno- and cytotoxic response of polyN-isopropylacrylamide (PNIPAM) nanoparticles to human keratinocyte (HaCaT) and colon cells (SW 480). **Toxicology Letters**, v. 198, p. 134–143, 2010.

O’SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, p. 173–207, 1997.

OCHOA, Y. R.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G. L.; CIPRIANI, T. R. Sulfation of fucogalactan from *Agaricus bisporus*: Different patterns in the chemical structure and their effects on anticoagulant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 357–364, 2017.

ODIAN, G. **Principles of Polymerization**. 4 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. 839 p.

PALANINATHAN, V.; CHAUHAN, N.; POULOSE, A. C.; *et al.* Acetosulfation of bacterial cellulose- An unexplored promising incipient candidate for highly transparent thin film. **Material Express**, v. 4, p. 415–421, 2014.

PARIDA, U. K.; BINDHANI, B. K.; BISWAL, S. K.; NAYAK, P. Advances in Cellulose-Based Graft Copolymers Prepared via Controlled Radical Polymerization Methods A Comprehensive Review. In: V. K. Thakur; **Cellulose-Based Graft Copolymers Structure and Chemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2015. 597 p.

PARVANIAN, S.; MOSTAFAVI, S. M.; AGHASHIRI, M. Multifunctional nanoparticle developments in cancer diagnosis and treatment. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 13, p. 81–87, 2017.

- PATRIZI, M. L.; PIANTANIDA, G.; COLUZZA, C.; MASCI, G. ATRP synthesis and association properties of temperature responsive dextran copolymers grafted with poly(N-isopropylacrylamide). **European Polymer Journal**, v. 45, p. 2779–2787, 2009.
- PECORARO, É.; MANZANI, D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Bacterial Cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: Preparation, Properties and Applications. In: M. N. Belgacem; A. Gandini (Eds.); **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. 1 ed., Amsterdam: Elsevier Ltd, 2008. 560 p.
- PIRES, N. R.; CUNHA, P. L. R.; MACIEL, J. S.; *et al.* Sulfated chitosan as tear substitute with no antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 92–99, 2013.
- QIN, Z.; JI, L.; YIN, X.; *et al.* Synthesis and characterization of bacterial cellulose sulfates using a SO<sub>3</sub>/pyridine complex in DMAc/LiCl. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 947–953, 2014.
- QIU, F.; FENG, J.; WU, D.; ZHANG, X.; ZHUO, R. Nanosized Micelles Self-Assembled from amphiphilic dextran- graft - methoxypolyethylene glycol / poly ( ε -caprolactone ) copolymers. **European Polymer Journal**, v. 45, p. 1024–1031, 2009.
- QIU, X.; HU, S. “Smart” materials based on cellulose: A review of the preparations, properties, and applications. **Materials**, v. 6, p. 738–781, 2013.
- RICHTER, A.; KLEMM, D. Regioselective sulfation of trimethylsilyl cellulose using different SO<sub>3</sub>-complexes. **Cellulose**, v. 10, n. 2, p. 133–138, 2003.
- ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 55, p. 35–58, 1991.
- ROY, D.; SEMSARILAR, M.; GUTHRIE, J. T.; PERRIER, S. Cellulose modification by polymer grafting: a review. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 2046, 2009.
- SÁ-LIMA, H.; TUZLAKOGLU, K.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide)-g-methylcellulose hydrogel as a three-dimensional extracellular matrix for cartilage-engineered applications. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 98 A, p. 596–603, 2011.
- SCHILD, H. G. Poly ( N-Isopropylacrylamide ): Experiment , Theory and Application. **Progress in Polymer Science**, v. 17, p. 163–249, 1992.

SCHLUFTER, K.; HEINZE, T. Carboxymethylation of bacterial cellulose. **Macromolecular Symposia**, v. 294, n. 2, p. 117–124, 2010.

SCHWEIGER, R. G. New cellulose sulfate derivatives and applications. **Carbohydrate Research**, v. 70, p. 185–198, 1979.

SÈBE, G.; HAM-PICHAVANT, F.; IBARBOURE, E.; KOFFI, A. L. C.; TINGAUT, P. Supramolecular structure characterization of cellulose II nanowhiskers produced by acid hydrolysis of cellulose I substrates. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 570–578, 2012.

SHI, H. Y.; ZHANG, L. M. New grafted polysaccharides based on O-carboxymethyl-O-hydroxypropyl guar gum and N-isopropylacrylamide: Synthesis and phase transition behavior in aqueous media. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 337–342, 2007.

SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulosic bionanocomposites: A review of preparation, properties and applications. **Polymers**, v. 2, p. 728–765, 2010.

STEICHEN, S. D.; CALDORERA-MOORE, M.; PEPPAS, N. A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 416–427, 2013.

SULAEVA, I.; HENNIGES, U.; ROSENAU, T.; POTTHAST, A. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1547–1571, 2015.

SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; *et al.* Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, v. 26, p. 419–431, 2005.

TALELLI, M.; RIJCKEN, C. J. F.; NOSTRUM, C. F. VAN; STORM, G.; HENNINK, W. E. Micelles based on HPMA copolymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 231–239, 2010..

TAN, Y.; ZHANG, L.; LI, Z. Synthesis and characterization of new amphoteric graft copolymer of sodium carboxymethyl cellulose with acrylamide and DMAEMA. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 69, p. 879–885, 1998.

TORGER, B.; VEHLLOW, D.; URBAN, B.; *et al.* Cast adhesive polyelectrolyte complex particle films of unmodified or maltose-modified poly(ethyleneimine) and cellulose sulphate:

fabrication, film stability and retarded release of zoledronate. **Biointerphases**, v. 8, p. 25, 2013.

UCHECHI, O.; OGBONNA, J. D. N.; ATTAMA, A. A. Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery. **Application of Nanotechnology in Drug Delivery**. London: IntechOpen, 2014. p.544.

ULLAH, H.; BADSHAH, M.; MÄKILÄ, E.; *et al.* Fabrication, characterization and evaluation of bacterial cellulose-based capsule shells for oral drug delivery. **Cellulose**, v. 24, p. 1445–1454, 2017.

UMAR, A.; SANAGI, M. M.; SALISU, A.; *et al.* Preparation and characterization of starch grafted with methacrylamide using ammonium persulphate initiator. **Materials Letters**, v. 185, p. 173–176, 2016.

UMMARTYOTIN, S.; MANUSPIYA, H. A critical review on cellulose: From fundamental to an approach on sensor technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 402–412, 2014.

VARGHESE, J. M.; ISMAIL, Y. A.; LEE, C. K.; *et al.* Thermoresponsive hydrogels based on poly(N-isopropylacrylamide)/chondroitin sulfate. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 135, p. 336–341, 2008.

VASILE, C.; NITA, L. E. Novel multi-stimuli responsive sodium alginate-grafted-poly(N-isopropylacrylamide) copolymers: II. Dilute solution properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 77–84, 2011.

WANG, H.; LI, J.; ZHANG, X.; *et al.* Synthesis, characterization and drug release application of carbon nanotube-polymer nanosphere composites. **RSC Advances**, v. 3, p. 9304, 2013.

WANG, L.-Q.; TU, K.; LI, Y.; *et al.* Synthesis and characterization of temperature responsive graft copolymers of dextran with poly(N-isopropylacrylamide). **Reactive and Functional Polymers**, v. 53, p. 19–27, 2002.

WANG, M.-J.; XIE, Y.-L.; CHEN, Z.-J.; YAO, S.-J. Optimizing preparation of NaCS-Chitosan coomplex to form a potential material for the colon-specific drug delivery system. **Jornal of Applied Polymer Science**, v. 117, p. 3001–3012, 2010.

WANG, Y.; WANG, J.; GE, L.; *et al.* Synthesis, properties and self-assembly of intelligent core-shell nanoparticles based on chitosan with different molecular weight and N-isopropylacrylamide. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, p. 3749–3759, 2013.

WANG, Z. M.; LI, L.; ZHENG, B. S.; NORMAKHAMATOV, N.; GUO, S. Y. Preparation and anticoagulation activity of sodium cellulose sulfate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 376–382, 2007.

WARD, M. A.; GEORGIU, T. K. Thermoresponsive polymers for biomedical applications. **Polymers**, v. 3, p. 1215–1242, 2011.

WEI, H.; CHENG, S.-X.; ZHANG, X.-Z.; ZHUO, R.-X. Thermo-sensitive polymeric micelles based on poly(N-isopropylacrylamide) as drug carriers. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 893–910, 2009.

WILHELM, M.; ZHAO, C. LE; WANG, Y.; *et al.* Poly(styrene-ethylene oxide) Block Copolymer Micelle Formation in Water: A Fluorescence Probe Study. **Macromolecules**, v. 24, p. 1033–1040, 1991.

WILTSEY, C.; KUBINSKI, P.; CHRISTIANI, T.; *et al.* Characterization of injectable hydrogels based on poly(N-isopropylacrylamide)-g-chondroitin sulfate with adhesive properties for nucleus pulposus tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, p. 837–847, 2013.

WU, Q.-X.; LIN, D.-Q.; YAO, S.-J. Fabrication and formation studies on single-walled CA/NaCS-WSC microcapsules. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 909–915, 2016.

YAO, S. An improved process for the preparation of sodium cellulose sulphate. **Chemical Engineering Journal**, v. 78, p. 199–204, 2000.

YILMAZ, E.; YALINCA, Z.; YAHYA, K.; SIROTINA, U. pH responsive graft copolymers of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 90, p. 68–74, 2016.

YU, J.-L.; YANG, F.; LIU, Z.-H.; LIU, Y.-N.; LI, G. Preparation and characterization of C10-C14 alkyl cellulose ester sulfate surfactant. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 17, p. 647–653, 2014.

YU, N.; LI, G.; GAO, Y.; JIANG, H.; TAO, Q. Thermo-sensitive complex micelles from sodium alginate-graft-poly(N-isopropylacrylamide) for drug release. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 296–301, 2016.

ZHANG, J.; CUI, Z.; FIELD, R.; *et al.* Thermo-responsive microcarriers based on poly(N-isopropylacrylamide). **European Polymer Journal**, v. 67, p. 346–364, 2015.

ZHANG, K.; BRENDLER, E.; GEISSLER, A.; FISCHER, S. Synthesis and spectroscopic analysis of cellulose sulfates with regulable total degrees of substitution and sulfation patterns via <sup>13</sup>C NMR and FT Raman spectroscopy. **Polymer**, v. 52, p. 26–32, 2011.

ZHANG, Q.; LIN, D.; YAO, S. Review on biomedical and bioengineering applications of cellulose sulfate. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 311–322, 2015.

ZHU, L.; QIN, J.; YIN, X.; *et al.* Direct sulfation of bacterial cellulose with a ClSO<sub>3</sub>H/DMF complex and structure characterization of the sulfates. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 25, p. 168–172, 2014.