 <https://doi.org/10.56238/tecavanaborda-020>

Ketlin Cristine Batista Mancinelli

Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Joinville, Santa Catarina, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9571-3008>

E-mail: ketlin.cb@gmail.com

Victória Mendes

Departamento de Engenharia Química, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Joinville, Santa Catarina, Brasil.

Marcia Margarete Meier

Programa de Pós-graduação em Química Tecnológica, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Joinville, Santa Catarina, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2475-5403>

Ana Paula Testa Pezzin

Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Joinville, Santa Catarina, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9343-3929>

Gilmar Sidnei Erzinger

Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Joinville, Santa Catarina, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6262-4677>

RESUMO

Estratégias a fim de superar os pontos fracos dos biopolímeros e ampliar sua área de aplicação vêm sendo largamente estudadas, e uma das alternativas consiste em combina-los com outros materiais

(plastificantes, outros polímeros e biopolímeros, extratos naturais, agentes antimicrobianos, grupos aminoalquil, agentes reticulante). Este estudo buscou investigar a melhor estratégia de incorporação da solução aquosa de schizophyllan (SPG) na membrana de celulose bacteriana (CB) com o objetivo de conferir ao produto final propriedades atraentes para aplicações na área médica. Para promover maior afinidade entre os biopolímeros, a membrana de CB foi modificada com um aminosilano. Metodologias diferentes foram testadas e a eficiência de incorporação do SPG em matriz de CB foi avaliada. Por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) foi possível identificar que a CB que foi funcionalizada apresentou bandas em torno de 1600 cm⁻¹ atribuídas às deformações de grupos NH₂. Entretanto, a análise de difratometria de Raios X (DRX) não revelou a presença do SPG, mas usando outra metodologia o SPG estava presente pelo surgimento de um novo pico em aproximadamente 28 ° (2θ). Existe um indicativo pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da presença do SPG na matriz da celulose. Quanto a estabilidade térmica dos biocompósitos não ocorram mudanças significativas que comprometessem a sua aplicabilidade. Este estudo mostrou que as metodologias abordadas são complementares e devem ser fundidas para obtenção de melhores resultados e que uma das metodologias aplicadas aos biopolímeros sem modificação deve ser melhor investigada.

Palavras-chave: Schizophyllan, Celulose Bacteriana, Grupo Aminoalquilsilano.

1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos são biopolímeros que ocorrem largamente na natureza em algas, plantas, animais, bactérias e fungos, e representam grande parte da biomassa do planeta. Devido a versatilidade desses materiais e biodegradabilidade, alguns desses polissacarídeos estão sendo utilizados nas indústrias de embalagem, alimentícia, farmacêutica e biomédica como materiais sustentáveis e renováveis (TORRES *et al.*, 2019). Esses biopolímeros estão cada vez mais presentes em aplicações biomédicas, como em curativos na cicatrização de feridas por serem de origem natural, abundantes na natureza, absorventes, não tóxicos, não imunogênicos e apresentarem custo relativamente baixo. Além

disso, componentes bioativos podem ser incorporados a esses biopolímeros a fim de auxiliarem no processo de cicatrização (ADUBA Jr; YANG, 2017).

O schizophyllan (SPG) é um polissacarídeo produzido pelo fungo basidiomiceto *Schizophyllum commune* e consiste de β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana na cadeia principal e β -(1 \rightarrow 6)-D-glucosil na cadeira lateral, a cada três unidades de glucose (RAU *et al.*, 1992). O SPG foi descrito pela primeira vez na literatura no final da década de 1960 e o interesse por este polissacarídeo aumentou fortemente à medida que a comunidade científica começou a apontá-lo como sendo eficaz contra infecções e tumores (CARVALHO *et al.*, 2021). Este biopolímero vem sendo descrito por apresentar bioatividades incluindo atividades imunomoduladoras, anticancerígenas, antitumorais, anti-inflamatórias e antioxidantes (DU *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2013; ZHONG *et al.*, 2015). Além disso, apresenta efeito cicatrizante em feridas (SEO *et al.*, 2019) e também pode ser empregado em produtos cosméticos com diversos benefícios para a pele (CONTIPRO, 2022, web).

O SPG apresenta baixa capacidade de formação de filme (HAMEDİ *et al.*, 2020), característica que pode ser limitante para determinadas aplicações. Por esse motivo, novas tecnologias se fazem necessárias para suplantiar algumas limitações quanto a aplicação. Na literatura é possível encontrar alguns estudos em que o SPG pode apresentar um melhor desempenho em combinação com outros polímeros na aplicação em curativos (SAFAEE-ARDAKANI *et al.*, 2019a; SAFAEE-ARDAKANI *et al.*, 2019b; SAFAEE-ARDAKANI *et al.*, 2022; HAMEDİ *et al.* 2020; HAMEDİ & SHOJAOSADATI, 2021; MUTHURAMALINGAM *et al.* 2019). Hamedí *et al.* (2020) desenvolveram um novo hidrogel combinado pelos biopolímeros de celulose bacteriana (CB) e SPG com propriedades mecânicas, capacidade de absorção de água e atividade antibacteriana incrementadas. A fim de promover melhor interação com o SPG, a CB foi primeiramente funcionalizada com 3-(aminopropil)trietoxissilano (APTES) e o compósito reticulado com glutaraldeído.

O glutaraldeído é um agente de reticulação comumente utilizado, mas que pode causar alguns efeitos colaterais indesejáveis e risco à saúde. Outros caminhos vêm sendo explorados, como o uso de ácidos carboxílicos (ácido cítrico) (CIECHOLEWSKA-JUŚKO *et al.*, 2021; FRONE *et al.*, 2020; MEFTAHI *et al.*, 2018). Aldeídos considerados “verdes” também vêm sendo utilizados como agentes de reticulação, como a vanilina (FRONE *et al.*, 2020; PENG *et al.*, 2010; TOMADONI *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2015; ZOU; LI; LI, 2015) e o cinamaldeído (GADKARI *et al.*, 2019; GAO; YANG, 2017). Além disso, esses aldeídos podem apresentar outras propriedades interessantes em aplicações biomédicas (COX *et al.*, 2021; TOMADONI *et al.*, 2019).

Outro polissacarídeo é a celulose bacteriana (CB) que pode ser obtida por culturas estáticas que produzem uma membrana de celulose na interfase líquido/ar (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991). A biossíntese da CB ocorre quando as bactérias polimerizam resíduos de glucose em cadeias lineares

de β -1,4-glucana (CZAJA *et al.*, 2006). Algumas das principais vantagens da CB são a sua estrutura nanoporosa, alto teor de água e grupos hidroxila livres (CACICEDO *et al.*, 2016). A última característica é importante na modificação química da CB, que é possível justamente pela presença de grupos hidroxila em sua estrutura (WAHID *et al.*, 2021). Pode-se citar outras propriedades da CB como a alta pureza, biocompatibilidade, não toxicidade, estabilidade mecânica, permeabilidade a líquidos e gases (PORTELA *et al.*, 2019; SULAEVA *et al.*, 2015). A CB se apresenta como um material promissor para aplicação como curativo no processo de cura de feridas, pois fornece um ambiente úmido acarretando em melhor cicatrização, mas não possui atividade antimicrobiana a fim de prevenir possível infecção (LIYASKINA *et al.*, 2018; MANEERUNG; TOKURA; RUJIRAVANIT, 2008; BARUD *et al.*, 2016).

No que se refere a área de tecnologia de materiais, os biopolímeros podem ser complementares, a mistura da CB com diferentes biopolímeros pode ser alcançada por mistura física, grafitação química ou pelo uso de agente de reticulação, *cross-linker* (WAHID *et al.*, 2021). Alguns exemplos de misturas de CB com outros biopolímeros são, a quitosana (CACICEDO *et al.*, 2020), dextrana (LIN *et al.*, 2017) e o SPG (HAMED I *et al.*, 2020). Desta forma, este estudo teve como objetivo abordar uma estratégia de desenvolvimento de uma membrana biocompósito candidata a aplicação como um curativo na cicatrização de feridas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

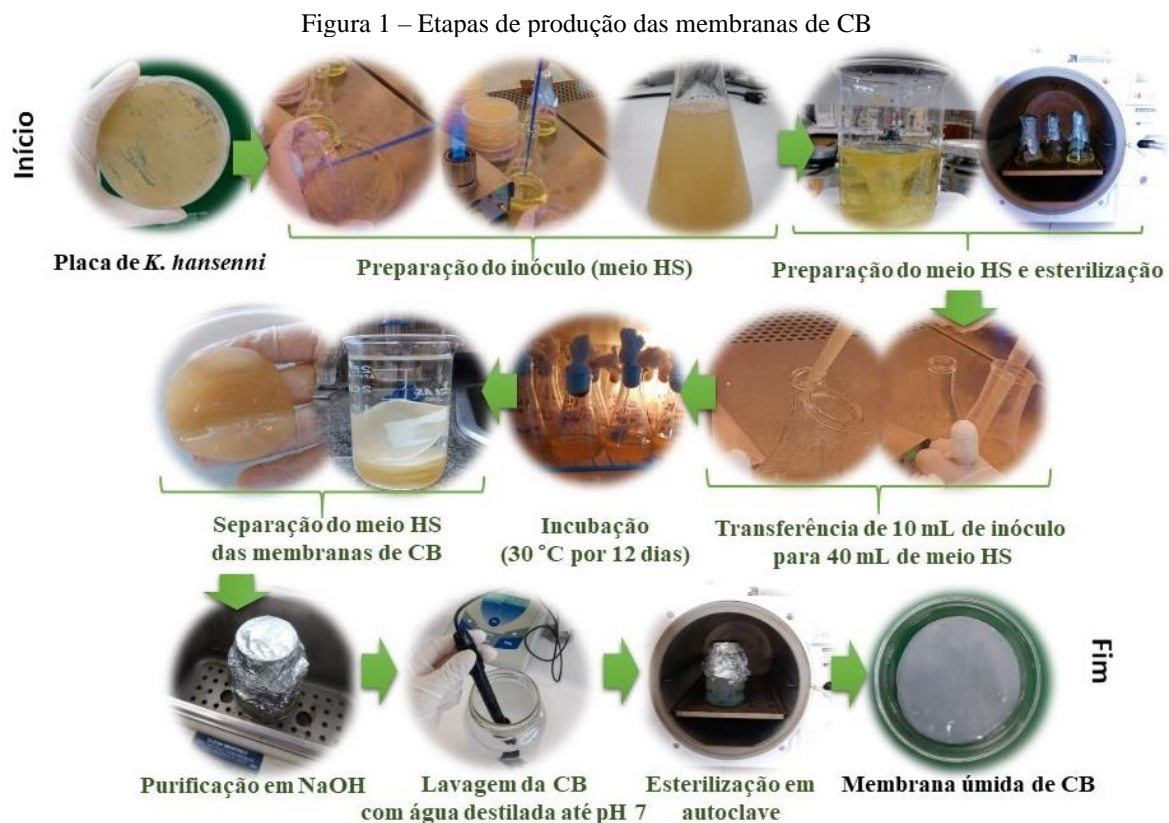
2.1 MATERIAIS

As membranas de CB foram produzidas no laboratório de Biotecnologia 1 (Biotec 1) da Universidade da Região de Joinville – Univille, utilizando a bactéria *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 em meio de cultivo Hestrin-Schram - HS. O (3-Aminopropil) trietoxisilano (APTES ou APTS) (99%) (CAS Number 919-30-2) foi adquirido da Sigma-Aldrich. A Vanilina (99%) (CAS Number 121-33-5) foi adquirida da Sigma-Aldrich. O SPG comercial foi gentilmente fornecido pela empresa da República Checa Contipro intermediado pelo grupo MCassab – Brasil.

2.2 PRODUÇÃO DE CB

O meio de cultivo, tanto na fase de ativação das células (pré-inóculo) quanto na fase de produção das membranas foi o meio HS, constituído de: manitol (20 g L⁻¹), peptona de soja (5 g L⁻¹), extrato de levedura (5 g L⁻¹), fosfato dissódico (2,7 g L⁻¹) e ácido cítrico (1,15 g L⁻¹) (HESTRIN; SCHRAMM, 1954). O meio para obtenção do inóculo e o meio de cultivo foram autoclavados a 121 °C por 20 min a 1 atm. Para preparação do inóculo, uma suspensão de células de densidade óptica (DO) igual a 1, medida em espectrofotômetro, a 600 nm foi preparada. As células foram incubadas a

30 °C, sob condição estática, por 24 h. Após este período, o inóculo foi transferido para o meio de cultivo HS a uma taxa de 20% (v/v). Esta etapa foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio para crescimento (40 mL de meio HS + 10 mL de inóculo) e incubados a 30 °C em condição estática por 12 dias para a formação das membranas úmidas de CB (FISCHER *et al.*, 2017). Para a remoção das células bacterianas, as membranas de CB foram lavadas com água destilada e transferidas para um Becker contendo NaOH 0,1 M em banho-maria a 80 °C por 1 h. As membranas foram lavadas abundantemente com água destilada repetidas vezes, a fim de remover resíduos celulares bacterianos, componentes do meio e o excesso de NaOH. O processo de lavagem foi finalizado até atingir pH próximo da neutralidade. Posteriormente, as membranas úmidas foram autoclavadas em água destilada a 121 °C por 20 min a 1 atm e mantidas a 4 °C até uso futuro. A Figura 1 apresenta um esquema simplificado da metodologia de produção da CB.



2.3 MODIFICAÇÃO QUÍMICA SUPERFICIAL DA CB COM APTES

Metodologias de modificação química superficial de membranas de CB com o uso de APTES foram testadas com base inicialmente na metodologia proposta por Frone *et al.* (2020) com adaptações e suas variações estão apresentadas na Tabela 1. As metodologias foram selecionadas primeiramente com base em análises visuais conjuntamente como a análise de FTIR. As metodologias escolhidas foram denominadas de Procedimentos 3 e 9 e estudadas com maior profundidade e consistem

basicamente em: primeiramente, 1,0 g de APTES foi pré-hidrolisado em uma mistura de 100 mL de água destilada e etanol absoluto (99,8%) (90/10 v/v%) a temperatura ambiente por 2 h. Um total de 5 membranas úmidas purificadas de CB foram adicionadas a solução de silano e agitadas a temperatura ambiente por 24 h. As membranas foram retiradas da solução de APTES e liofilizadas para evitar o colapso dos poros da CB amino-funcionalizada (CBA) antes da reação de condensação (aquecimento). As membranas foram aquecidas em estufa com circulação de ar a 110 °C por 2 h a fim de promover a reação química de condensação. Após resfriamento, as membranas modificadas foram submetidas a lavagens diferenciadas conforme procedimentos descritos abaixo:

- Lavagem do Procedimento 3: nesta etapa 5 lavagens com álcool etílico 96% foram realizadas de 10 min em banho ultrassônico. As membranas foram lavadas em água destilada.

- Lavagem do Procedimento 9: esta etapa foi conduzida em 2 fases em banho ultrassônico com enxagues de 10 min, da seguinte forma: na primeira etapa as membranas foram mergulhadas em etanol/água (30/70%), depois no segundo enxague em etanol/água (70/30%) e no terceiro enxague em etanol (100%). Na segunda etapa foi realizada a rehidratação em etanol/água (70/30%), etanol/água (30/70%) e água destilada (100%) (*overnight*).

Posteriormente, as membranas foram congeladas, liofilizadas e acondicionadas em dessecador; denominadas de CBA P3 (CBA do Procedimento 3) e CBA P9 (CBA do Procedimento 9).

Tabela 1- Variações nas metodologias utilizadas neste estudo.

Metodologia	etanol/água (vol%)	APTES (g)	Solução (mL)	N. de membranas	Tipo de lavagem
1	90/10	0,5	50	20	Soxhlet/etanol
2	90/10	1	100	5	Ultrassom/etanol
3	10/90	1	100	5	Ultrassom/etanol
4	90/10	0,5	50	10	Ultrassom /etanol+água
5*	10/90	0,05	100	5	Ultrassom /etanol+água
6	10/90	0,05	100	5	Ultrassom /etanol+água
7	10/90	0,5	100	5	Ultrassom /etanol+água
8	10/90	0,1	100	5	Ultrassom /etanol+água
9	10/90	1	100	5	Ultrassom /etanol+água

* Aquecimento 70 °C *overnight*

2.4 PREPARAÇÃO DOS BIOCOMPÓSITOS

A metodologias utilizadas nesta etapa do estudo foram:

- Metodologia 1: uma solução de SPG (1% m/v) foi preparada. A membrana de CBA P3 foi molhada na solução aquosa de SPG (1 mL), e então água destilada (10 mL) foi adicionada para facilitar a agitação constante das membranas a 50 °C por 72 h. Ao fim deste período, a vanilina (solução em etanol 2%) foi adicionada em massa na proporção de 50% em relação a massa seca de CBA. A membrana foi mantida 50 °C por 3 h sob agitação constante (150 rpm), sendo posteriormente lavadas (ultrassom por 30 min), congeladas e liofilizadas. O biocompósito foi denominado CBA-SPG-VA (1).

- Metodologia 2: primeiramente soluções aquosas de SPG e SPG-D (0,5% m/v) foram preparadas. As membranas de CBA P9 foram colocadas em um funil metálico com vácuo e submetidas a passagem das soluções aquosas de SPG e SPG-D (2 mL) através de seus poros, o processo foi finalizado quando encerrou-se a passagem da solução de SPG e SPG-D. As membranas foram mantidas por 24 h a 30 °C sem agitação. A solução de vanilina:etanol (2% m/v) foi adicionada considerando proporção de 2:1 em massa (CBA:VA). As membranas foram mantidas 50 °C por 3 h sob agitação constante (150 rpm) com água mili-Q (8 mL). As membranas foram lavadas com água destilada em ultrassom por 30 min para remover quaisquer excedentes, sendo posteriormente congeladas e liofilizadas. Os biocompósitos foram denominados CBA-SPG-VA (2) e CBA-SPG-D-VA (2).

- Metodologia 3: uma solução aquosa de SPG (1% m/v) foi preparada. A CB foi colocada em um funil metálico com vácuo e a passagem da solução aquosa de SPG foi forçada a passar (2,5 mL) através de seus poros. A CB foi mantida por 24 h a 30 °C sem agitação, sendo posteriormente congelada e liofilizada. O biocompósito foi denominado CB-SPG. Não foi realizada a reticulação da amostra.

2.5 CARACTERIZAÇÃO

2.5.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização dos grupamentos funcionais das membranas de CB, CBA P3, CBA P9 e dos biocompósitos foram feitas por FTIR, em um equipamento da Perkin Elmer Spectrum One no Laboratório de Caracterização de Materiais da UNIVILLE, no intervalo de 4.000 a 650 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e acessório de refletância total atenuada (ATR).

2.5.2 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)

As medições de XPS foram realizadas nas amostras de CB, CBA P3 e CBA P9 no laboratório de plasma, filmes e superfícies da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) usando um espectrômetro K-Alpha (Thermo Scientific) equipado com uma fonte monocromática de Al $K\alpha$ (1486,6 eV) e pressão base de 10^{-8} mBar. Os espectros de XPS foram registrados como espectros de pesquisa (passo de 1 eV) a uma energia de passagem de 200 eV.

2.5.3 Difratometria de Raios X (DRX)

Análises de DRX das amostras de CB e dos biocompósitos foram realizadas na Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC em um difratômetro Shimadzu modelo XRD-7000, com

radiação de cobre K_{α} , comprimento de onda, $\lambda = 1,54 \times 10^{-10}$, tensão de 40 kV e corrente de 40 mA, com velocidade de varredura de $2^{\circ}/\text{min}$ e intervalo de 5° a 70° (2 θ).

2.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da superfície de membranas de CB, CBA P3 e CBA P9 e dos biocompósitos foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura em um microscópio Eletrônico de Varredura Field Emission, modelo JSM-6701F, de fabricação da JEOL LTD, com tensão de 15 kV. Imagens de 5.000 e 10.000 vezes foram obtidas. A determinação da espessura média das fibrilas das membranas foi realizada utilizando o programa ImageJ, nas fotos obtidas por MEV com média de 10 medidas e desvio padrão.

2.5.5 Análise térmica – TGA

As análises termogravimétricas (TGA) das amostras de CB, CBA P3, CBA P9 e biocompósitos foram realizadas no Laboratório de Materiais da UNIVILLE em um equipamento da TA Instruments modelo TGA-Q50. As amostras liofilizadas foram aquecidas de 25 a 1000 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera inerte (N_2) em um porta amostra de platina.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE ESTRUTURAL POR FTIR, XPS E DRX

Na Figura 2A estão apresentados os espectros de FTIR da CB, CBA P3 e CBA-SPG-VA (1). Perfis de espectros similares foram encontrados na literatura para a CB produzida pelas bactérias *K. xylinus* e *K. hansenni* (CACICEDO *et al.*, 2020; VASCONCELOS *et al.*, 2020). A banda na região de 3340 cm^{-1} é característica de vibração de estiramento O-H na celulose (FERNANDES *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2013) e pode ser atribuída a celulose tipo I (MOHARRAM; MAHMOUD, 2008). Esta mesma banda para a CB P3 tornou-se mais ampla, o que pode ser atribuído à sobreposição com o sinal de vibração de estiramento de NH_2 (HAMED I *et al.*, 2020; HAMED I; SHOJAOSADATI, 2021). A banda por volta de 2900 cm^{-1} da CB é atribuída ao estiramento C-H de grupos CH_2 e CH_3 (WANG *et al.*, 2018). O incremento da banda em torno de 2900 cm^{-1} para a CBA P3 pode estar associado às vibrações CH_2 da porção propil da porção silano (FERNANDES *et al.*, 2013; SAINI; BELGACEM; BRAS, 2017). A banda por volta de 1645 cm^{-1} é característica de vibração de deformação de H-O-H das moléculas de água absorvida na celulose (GEA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2018). A banda em 1162 cm^{-1} corresponde ao estiramento assimétrico C-O-H na ligação β -(1 \rightarrow 4) (WANG *et al.*, 2018). Bandas em 1058 e 1034 cm^{-1} são atribuídas a deformação de ligação C-O-H de carboidratos ou vibração do anel C-O-C de piranose (WANG *et al.*, 2018).

No espectro da CBA P3, observa-se duas bandas novas em 1560 cm^{-1} e 1480 cm^{-1} (indicadas pelas setas) e outra banda em 1600 cm^{-1} que podem ser atribuídas às deformações de grupos NH_2 (FERNANDES *et al.*, 2013; FRONE *et al.*, 2020; HAMEDI *et al.*, 2020; SAINI; BELGACEM; BRAS, 2017). Outra banda em torno de 870 cm^{-1} aparece no espectro de CBA P3 e pode ser atribuída a deformação de grupos amino primários (NH_2) (HAMEDI *et al.*, 2020).

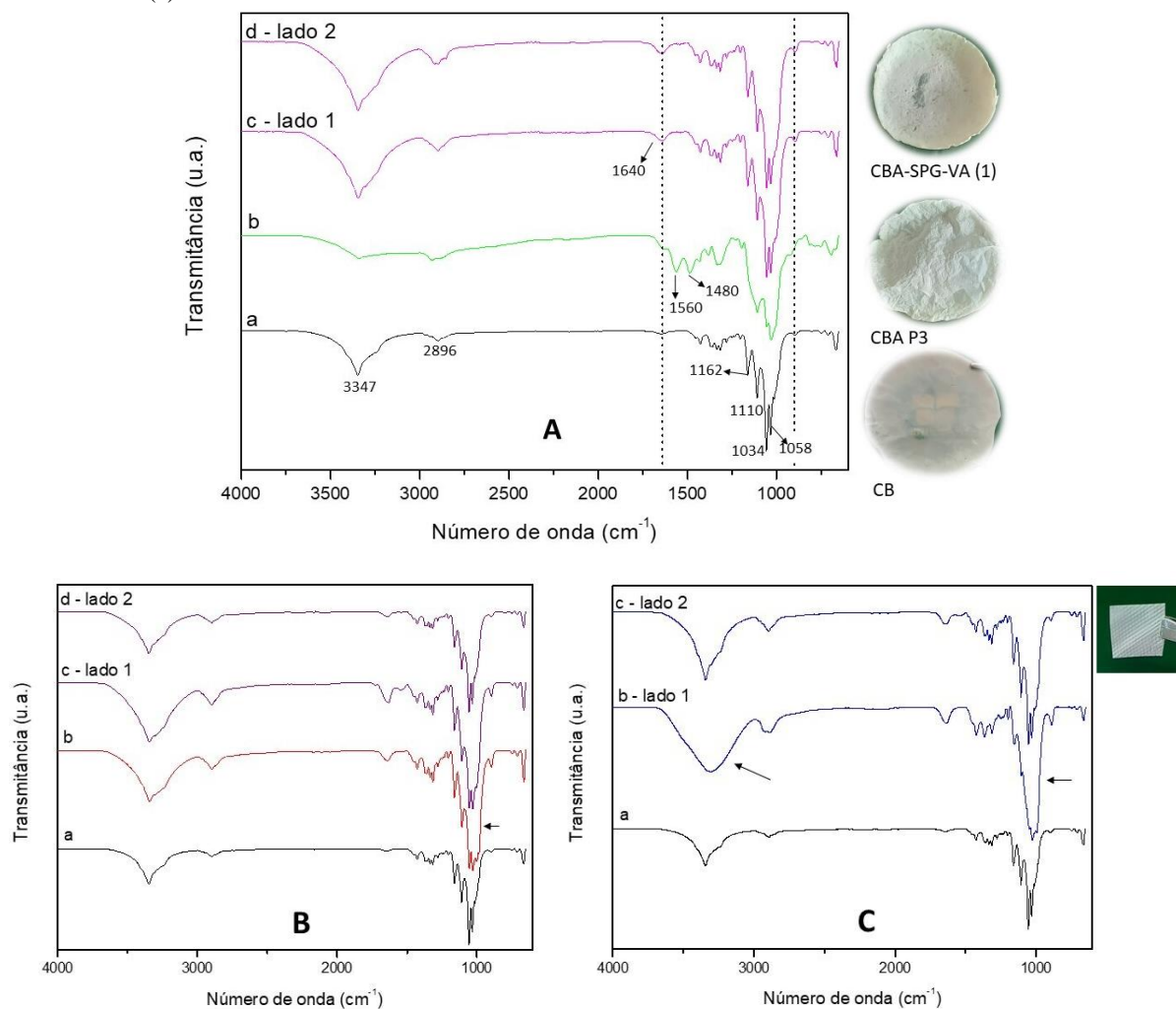
A presença de ligações Si-O-celulose e $-\text{Si-O-Si-}$ que correspondem à condensação dos grupos hidroxila do derivado de silano com os grupos hidroxila da CB; e silanóis que reagem entre eles mesmos, respectivamente, não são facilmente visualizados por FTIR, visto que essas vibrações típicas ocorrem por volta de 1150 e 1135 cm^{-1} e são mascaradas pelas grandes e intensas bandas de vibração C-O-C da CB (FERNANDES *et al.*, 2013).

Comparando CBA-SPG-VA (1) com CBA P3, observou-se que as bandas em torno de 1560 e 1480 cm^{-1} desapareceram, sendo um indicativo da efetiva reticulação com vanilina pela diminuição de grupos NH_2 . A banda em torno de 1640 cm^{-1} no espectro do filme CBA-SPG-VA (1) (ambos os lados da amostra) pode ser um indicativo de ligação C=N pela adição da vanilina como agente reticulante (FRONE *et al.*, 2020; TOMADONI *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2015; ZOU; LI; LI, 2015).

Na Figura 2B estão apresentados os espectros de FTIR da CB, CBA P9, CBA-SPG-VA (2). Para a amostra CBA P9 pode-se observar alguma mudança na intensidade relativa na região de ligação C-O-C da celulose (Figura 2B - identificado por seta); entretanto, bandas características de grupos NH_2 não são identificadas no espectro, sugerindo que não tenha ocorrido a modificação com o aminosilano. Optou-se por andamento dos estudos devido a maior homogeneidade e qualidade das amostras de CBA P9.

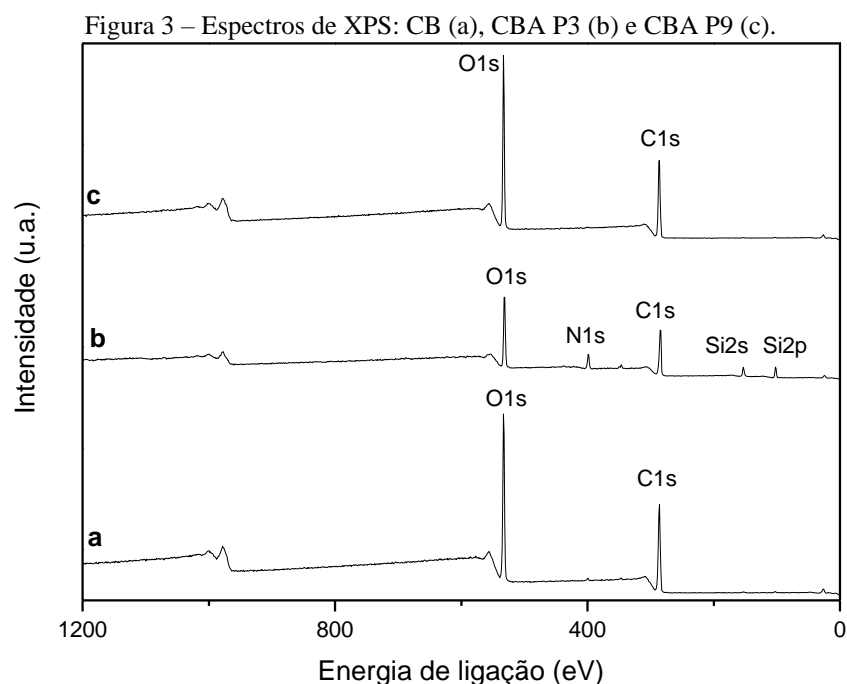
Na Figura 2C estão apresentados os espectros de FTIR da CB e CB-SPG. Para CB-SPG pode-se observar mudanças no perfil do espectro em comparação a CB relacionadas a região característica do anel de piranose e a banda característica de vibração de estiramento O-H que sofreu alargamento (lado 1) podendo ser resultado da presença do SPG. A ligação β característica do SPG encontra-se na faixa de $884-892\text{ cm}^{-1}$ (HAMEDI *et al.*, 2020) e ficaram de difícil definição nos espectros.

Figura 2 - Espectros de FTIR: A) CB (a), CBA P3 (b), CBA-SPG-VA (1) – lado 1 (c) e CBA-SPG-VA (1) – lado 2 (d); B) CB (a), CBA P9 (b), CBA-SPG-VA (2) – lado 1 (c), CBA-SPG-VA (2) – lado 2 (d); C) CB (a), CB-SPG – lado 1 (b) e CB-SPG – lado 2 (c).



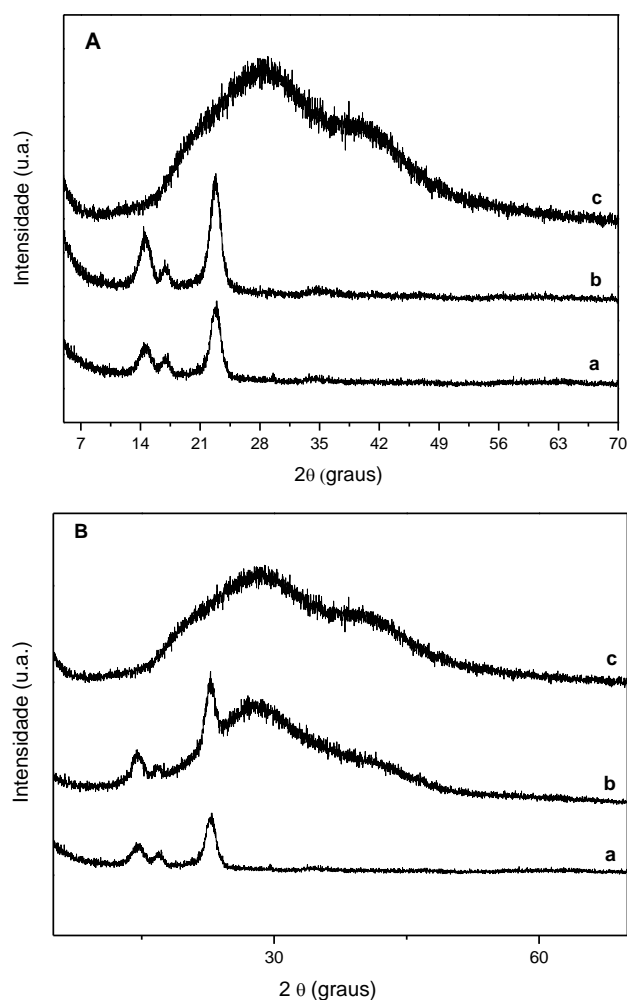
Com intuito de confirmar os resultados obtidos por FTIR, a análise de XPS foi realizada para as membranas CBA P3 e CBA P9. Esta análise auxiliou na determinação da composição química da superfície de membranas da CB e das membranas amino-funcionalizadas, sendo um indicativo da efetiva ou não modificação realizada com o aminosilano. O espectro de XPS da membrana de CB mostrou dois picos principais em 286,08 e 533,08 eV detectados, correspondendo à adsorção de C 1s e O 1s, respectivamente, o que indica que os principais componentes da CB são C e O (HE *et al.*, 2020). Picos quase imperceptíveis aparecem indicando os elementos cálcio (Ca) e flúor (F); entretanto, esses elementos não deveriam estar presentes. Na Figura 3, as varreduras dos espectros de XPS mostram claramente dois picos principais para a CBA P3 em 285,08 eV e 531,08 eV que correspondem às adsorções C 1s e O 1s, respectivamente. Além disso, três novos picos estão presentes, um novo pico em 399,08 eV na região N 1s e dois picos em 102,08 eV e 153,08 eV correspondentes às energias de ligação de Si 2s e 2p, respectivamente (SHAO *et al.*, 2017). De acordo com os resultados de XPS, a

amostra CBA P9 não apresenta indícios de efetiva modificação superficial com o aminosilano, confirmando resultado de FTIR.



As misturas foram estudadas por DRX a fim de analisar as alterações causadas pela incorporação do SPG na matriz de CBA P3 e CBA P9. A CB apresentou ângulos de Bragg em $2\theta = 14,5^\circ$, $16,9^\circ$ e $22,9^\circ$ (CACICEDO *et al.*, 2020). Ligações de hidrogênio mais fracas podem resultar em mudança de cristalinidade da estrutura de rede da CB (CACICEDO *et al.*, 2020). Entretanto, mudanças pouco significativas podem ser visualizadas (Figura 4A - espectros a e b), o que não corrobora com os resultados obtidos por Hamedi; Shojaosadati (2021) em que constataram que a intensidade dos picos característicos da CB diminuiu e o pico em $17,2^\circ$ (em 2θ) praticamente desapareceu, indicando diminuição da cristalinidade da CB após a amino-funcionalização e adição de SPG. Os resultados indicaram a não bem-sucedida incorporação do SPG dentro da rede de CBA P3. Na Figura 4B alterações nos espectros dos biocompósitos pela incorporação do SPG (espectro b) na matriz de CBA P9 podem ser visualizadas. Picos largos em torno de 28° (2θ) aparecem para o biocompósito, o que pode ser um indicativo da presença de SPG.

Figura 4 - Difratogramas de raios de X: A) CB (a), CBA-SPG-VA (1) (b), SPG (c); B) CB (a), CBA-SPG-VA (2) (b), SPG (c).



3.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MEV

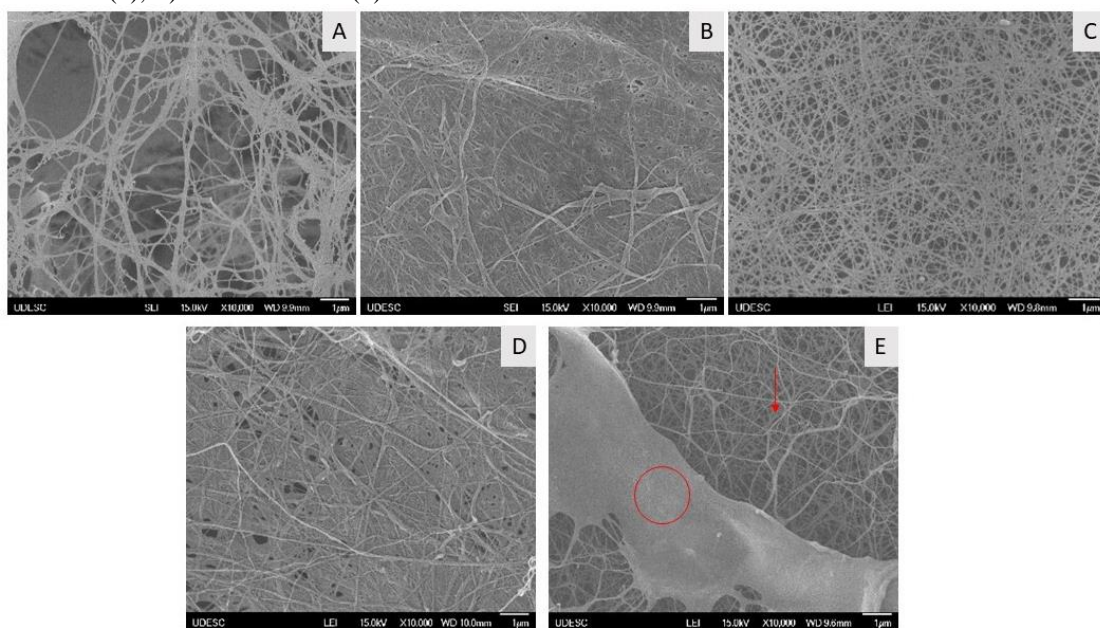
As morfologias de superfície das membranas de CB, CBA P3, CBA P9 e dos biocompósitos estão apresentadas na Figura 5 e auxiliam na identificação de mudanças na estrutura e porosidade das membranas, assim como, na identificação da presença do SPG na estrutura de CBA. Na Figura 5A a CB apresenta uma estrutura de rede tridimensional (3D) bem organizada e uma morfologia porosa com uma rede de microfibrilas espaçadas características da CB liofilizada (KIM *et al.*, 2011; CACICEDO *et al.*, 2020). A CBA P3 (Figura 5B) em comparação com a CB revelou que a modificação com aminosilano acarretou em diminuição na abertura entre as fibrilas, ou seja, um menor espaçamento entre elas. Isso também foi observado por Fernandes *et al.* (2013) em que as membranas de CB-NH₂ mostraram uma estrutura de rede 3D típica da CB; porém, as nanofibrilas apresentaram-se mais espessas decorrente da cobertura com uma estrutura de silano 3D em que os autores associaram a formação de pontes Si-O-Si. Shao *et al.* (2017) também observaram uma morfologia espessa e densa devido à cobertura com grupos aminoalquilsilano na superfície da membrana de CB amino-

funcionalizada com APTES. A amostra CBA P9 (Figura 5C) apresentou um perfil de fibrilas mais homogêneo quando comparada a CB, porém sem o espessamento visto na Figura 5B.

A adição da solução aquosa de SPG (1% m/v) não parece ter produzido mudanças significativas na rede polimérica da CBA P3, porém para a CBA-SPG-VA (1), existe uma tendência de incremento na porosidade. Este fato foi também percebido por análise visual, indicando que a reticulação química com vanilina contribuiu para a recuperação da amostra. A presença do SPG não fica clara.

A Figura 5E mostra que o SPG parece recobrir a superfície da CBA P9, observa-se claramente a presença de duas fases: a fase da CBA P9 (seta em vermelho) e a fase do SPG evidenciada pela parte lisa (círculo em vermelho). Em outro estudo, Hamedi *et al.* (2020) observaram que após a imersão da CB em solução de SPG (1% m/v) a morfologia de superfície da CB mudou, o espaço entre as fibrilas foi preenchido e a rede de fibrilas foi totalmente coberta com o SPG, sendo a estrutura significativamente alterada pelo acúmulo de SPG. Já neste trabalho, não se observou esta tendência de preenchimento, o que pode ser influenciada pela quantidade de SPG utilizada. A morfologia de CB-SPG deve ser investigada ainda.

Figura 5 – Micrografias de MEV de superfície de CB e CBA com aumento de 10.000x: A) CB, B) CBA P3, C) CBA P9, D) CBA-SPG-VA (1), E) CBA-SPG-VA (2).



3.3 ANÁLISE TÉRMICA POR TGA

O estudo de degradação térmica das membranas de CB, CBA P3, CBA P9 e suas respectivas misturas foi conduzido para melhor entendimento da estabilidade térmica e perfil de degradação das membranas funcionalizadas com aminosilano e incorporação do SPG, bem como um indicativo de efetiva modificação pelo percentual de resíduo resultante ao final da curva TG.

Geralmente a CB apresenta dois eventos significativos de perda de massa. O primeiro evento ocorre entre 25 °C até 150-200 °C relacionado principalmente a evaporação de água; o segundo evento com maior perda de massa é observado em torno de 330 °C (BARUD *et al.*, 2011; CACICEDO *et al.*, 2020).

Uma queda brusca de massa próximo de 334 °C (T_{onset}) é observada para a CB com perda de massa em torno de 86%, esse evento de perda de massa é descrito na literatura como sendo a degradação da celulose, caracterizada pela despolimerização e decomposição de unidades glicosídicas (VASCONCELOS *et al.*, 2020). Neste segundo evento, para todas as membranas ocorreu a maior perda de massa (%), esta queda em termos de massa inicia-se em 295 °C para a CBA P3 e em 329 °C para a CBA P9 (Tabela 2). A diminuição da temperatura de início de degradação para a membrana CBA P3 é um indicativo de perda em estabilidade térmica que quando comparada a CB é de aproximadamente 12%. Este valor de temperatura de início de degradação encontrado para todas as membranas, possibilitam aplicações em que a CB necessite passar pelo processo de esterilização em autoclave em condições de 1 atm a 121 °C. As temperaturas máximas de degradação (T_{max}) para a CB, CBA P3 e CBA P9 ocorreram em 362 °C, 350 °C e 359 °C, respectivamente.

O resíduo ao final da curva TG em 1000 °C para a CB é de 1,6% e correspondente à oxidação e decomposição do resíduo carbonizado e formação de produtos gasosos de baixa massa molecular (VASCONCELOS *et al.*, 2020). O percentual de resíduo da membrana CBA P3 em comparação a CB aumentou em aproximadamente 92% e pode ser um indicativo da bem-sucedida funcionalização da membrana de CB com aminosilano pela presença de material inorgânico de SiO₂ (FERNANDES *et al.*, 2013). Para a CB P9, o percentual de resíduo praticamente nulo pode estar associado a não funcionalização da membrana, confirmando os resultados obtidos por FTIR e XPS. Frone *et al.* (2020) encontraram valores de resíduo (até 700 °C) para a CB e CB amino-funcionalizada de 4% e 12,5%, respectivamente.

A estabilidade térmica e o perfil de decomposição dos biocompósitos em comparação aos biopolímeros puros foram avaliados também por termogravimetria. O início da principal perda de massa ocorreu em temperaturas mais baixas para os biocompósitos em comparação a CB. O percentual de resíduo inorgânico para os biocompósitos aumentou em comparação a CB.

Tabela 2 – Principais dados obtidos das curvas TG da CB, CB amino-modificadas e biocompósitos.

Amostras	Dados da curva TG			
	T _{onset} °C	T _{max} °C	Perda de massa %	Resíduo em 1000 °C %
BC	333,99	361,82	86,46	1,60
CBA P3	295,06	350,20	48,37	19,41
CBA P9	328,62	359,22	81,41	0,41
CBA-SPG-VA (1)	334,11	360,09	84,87	4,68
CBA-SPG-VA (2)	330,27	353,83	79,43	3,72
CB-SPG	322,30	355,88	77,57	2,07

4 CONCLUSÕES

Membranas de CB amino-funcionalizadas foram obtidas usando em maior concentração água destilada sem ajuste de pH. Observou-se que mudanças na lavagem das membranas influenciaram o resultado final em termos de modificação. Perdas na porosidade foram observadas nas micrografias de MEV o que pode influenciar na molhabilidade das membranas. A modificação com aminosilano parece propiciar maior homogeneidade em relação ao tamanho de poros. Diante dos resultados, fica evidente que ocorreram mudanças na amostra amino-funcionalizada (CBA P3) com a introdução da vanilina (V). A membrana apresentou aspecto esponjoso e aparentemente um retorno a porosidade mais próxima da CB. Testes mecânicos podem ser interessantes para comprovar questão de resistência incrementada sugerida pela análise visual decorrentes da reticulação. Na metodologia 2 fica clara a presença do SPG na estrutura da CBA P9, mesmo não sendo amino-funcionalizada. Portanto, a metodologia 2 foi testada no desenvolvimento de CB-SPG e a incorporação do SPG ainda deve ser melhor investigada. As metodologias testadas são complementares e podem ser unidas para obtenção de melhores resultados.

AGRADECIMENTOS

Um dos autores (Ketlin C. B. Mancinelli) agradece a bolsa oferecida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). Os autores também agradecem o apoio financeiro do Fundo de Amparo à Pesquisa da Univille (FAP/Univille), a realização das análises de XPS, DRX e MEV pela Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) e ao fornecimento do SPG comercial pela empresa Contipro e MCassab.

REFERÊNCIAS

- Aduba jr, donald c.; yang, hu. Polysaccharide fabrication platforms and biocompatibility assessment as candidate wound dressing materials. *Bioengineering*, v. 4, n. 1, 2017.
- Barud, hernane s. *Et al.* Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes. *Carbohydrate polymers*, v. 83, n. 3, p. 1279–1284, 2011.
- Barud, h. G. De oliveira *et al.* A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: bacterial cellulose. *Carbohydrate polymers*, n. 153, p. 406–420, 2016.
- Cacicedo, maximiliano l. *Et al.* Chitosan-bacterial cellulose patch of ciprofloxacin for wound dressing: preparation and characterization studies. *International journal of biological macromolecules*, v. 147, p. 1136–1145, 2020.
- Cacicedo, maximiliano l. *Et al.* Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. *Bioresource technology*, v. 213, p. 172–180, 2016.
- Carvalho, layde t. *Et al.* Recent advances in the production of biomedical systems based on polyhydroxyalkanoates and exopolysaccharides. *International journal of biological macromolecules*, n. 183, p. 1514–1539, 2021.
- Ciecholewska-juško, daria *et al.* Superabsorbent crosslinked bacterial cellulose biomaterials for chronic wound dressings. *Carbohydrate polymers*, v. 253, 2021.
- Contipro, 2022. Schizophyllan beauty from mushrooms – disponível em: <<https://www.contipro.com/images/productlists/schizophyllan.pdf>>. Acesso em: 14, junho, 2022.
- Cox, harrison j. *Et al.* Bioinspired and eco-friendly high efficacy cinnamaldehyde antibacterial surfaces. *Journal of materials chemistry b*, v. 9, n. 12, p. 2918–2930, 2021.
- Czaja, wojciech *et al.* Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, v. 27, p. 145–151, 2006.
- Du, bin *et al.* Anti-inflammatory activity of polysaccharide from *schizophyllum commune* as affected by ultrasonication. *International journal of biological macromolecules*, v. 91, p. 100–105, 2016.
- Fernandes, susana c. M. *Et al.* Bioinspired antimicrobial and biocompatible bacterial cellulose membranes obtained by surface functionalization with aminoalkyl groups. *Acs applied materials and interfaces*, v. 5, n. 8, p. 3290–3297, 2013.
- Fischer, michele roberta *et al.* Biossíntese e caracterização de nanocelulose bacteriana para engenharia de tecidos. *Revista matéria*, v. 22, 2017.
- Frone, adriana nicoleta *et al.* Bacterial cellulose sponges obtained with green cross-linkers for tissue engineering. *Materials science and engineering c*, v. 110, 2020.
- Gadkari, rahul rajkumar *et al.* Green synthesis of chitosan-cinnamaldehyde cross-linked nanoparticles: characterization and antibacterial activity. *Carbohydrate polymers*, v. 226, 2019.

Gao, hongfang; yang, hui. Characteristics of poly(vinyl alcohol) films crosslinked by cinnamaldehyde with improved transparency and water resistance. *Journal of applied polymer science*, v. 134, n. 38, 2017.

Gea, saharman *et al.* Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. *Bioresource technology*, v. 102, n. 19, p. 9105–9110, 2011.

Hamedi, sepideh *et al.* A novel double-network antibacterial hydrogel based on aminated bacterial cellulose and schizophyllan. *Carbohydrate polymers*, v. 229, 2020.

Hamedi, sepideh; shojaosadati, seyed abbas. Preparation of antibacterial zno np-containing schizophyllan/bacterial cellulose nanocomposite for wound dressing. *Cellulose*, v. 28, n. 14, p. 9269–9282, 2021.

He, wei *et al.* Preparation of aminoalkyl-grafted bacterial cellulose membranes with improved antimicrobial properties for biomedical applications. *Journal of biomedical materials research - part a*, v. 108, n. 5, p. 1086–1098, 2020.

Hestrin s; schramm m. Synthesis of cellulose by acetobacter xylinum 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose*. *Biochemical journal*, v. 58, n. 2, p. 345–352, 1954.

Kim, jaehwan *et al.* Preparation and characterization of a bacterial cellulose/chitosan composite for potential biomedical application. *Journal of polymer research*, v. 18, n. 4, p. 739–744, 2011.

Lin, wen chun *et al.* Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. *Carbohydrate polymers*, v. 94, n. 1, p. 603–611, 2013.

Lin, shin ping *et al.* Novel dextran modified bacterial cellulose hydrogel accelerating cutaneous wound healing. *Cellulose*, v. 24, n. 11, p. 4927–4937, 2017.

Liyaskina, e. V. *Et al.* Bacterial cellulose/alginate nanocomposite for antimicrobial wound dressing. In the 2nd international symposium on physics, engineering and technologies for biomedicine, knee energy & physics, p. 202–211, 2018.

Maneerung, thawatchai; tokura, seiichi; rujiravanit, ratana. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydrate polymers*, v. 72, n. 1, p. 43–51, 2008.

Meftahi, a. *Et al.* Preventing the collapse of 3d bacterial cellulose network via citric acid. *Journal of nanostructure in chemistry*, v. 8, n. 3, p. 311–320, 2018.

Moharram, m. A.; mahmoud, osama m. Ftir spectroscopic study of the effect of microwave heating on the transformation of cellulose i into cellulose ii during mercerization. *Journal of applied polymer science*, v. 107, n. 1, p. 30–36, 2008.

Muthuramalingam, karthika *et al.* B-glucan-based wet dressing for cutaneous wound healing. *Advances in wound care*, v. 8, n. 4, p. 125–135, 2019.

Peng, hailong *et al.* Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. *Food chemistry*, v. 121, n. 1, p. 23–28, 2010.

Portela, raquel *et al.* Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. *Microbial biotechnology*, v. 12, p. 586–610, 2019.

Rau, udo *et al.* Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing. *Journal of industrial microbiology*, n. 9, p. 19-26, 1992.

Ross, p.; mayer, r.; benziman, m. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological reviews*, v. 55, n. 1, p. 35-58, 1991.

Safae-ardakani, mohammad reza *et al.* Electrospun schizophyllan/polyvinyl alcohol blend nanofibrous scaffold as potential wound healing. *International journal of biological macromolecules*, v. 127, p. 27–38, 2019a.

Safae-ardakani, mohammad reza *et al.* In situ preparation of pva/schizophyllan-agnps nanofiber as potential of wound healing: characterization and cytotoxicity. *Fibers and polymers*, v. 20, n. 12, p. 2493-2502, 2019b.

Safae-ardakani, mohammad reza *et al.* In vivo study of beta-glucan-based biogenic synthesis of silver nanocomposite using schizophyllum commune for wound dressings in a rat burn model. *Advances in natural sciences: nanoscience and nanotechnology*, v. 13, 2022.

Saini, seema; belgacem, mohamed naceur; bras, julien. Effect of variable aminoalkyl chains on chemical grafting of cellulose nanofiber and their antimicrobial activity. *Materials science and engineering c*, v. 75, p. 760–768, 2017.

Seo, gayoung *et al.* The wound healing effect of four types of beta-glucan. *Applied biological chemistry*, v. 62, n. 20, 2019.

Shao, wei *et al.* Novel bioactive surface functionalization of bacterial cellulose membrane. *Carbohydrate polymers*, v. 178, p. 270–276, 2017.

Sulaeva, irina *et al.* Bacterial cellulose as a material for wound treatment: properties and modifications: a review. *Biotechnology advances*, v. 33, p. 1547–1571, 2015.

Tomadoni, b. *Et al.* Vanillin as a natural cross-linking agent in chitosan-based films: optimizing formulation by response surface methodology. *Polymer testing*, v. 78, 2019.

Torres, f. G.; arroyo, j. J.; troncoso, o. P. Bacterial cellulose nanocomposites: an all-nano type of material. *Materials science & engineering c*, v. 98, p. 1277–1293, 2019.

Vasconcelos, niédja fittipaldi *et al.* Oxidized bacterial cellulose membrane as support for enzyme immobilization: properties and morphological features. *Cellulose*, v. 27, n. 6, p. 3055–3083, 2020.

Wahid, fazli *et al.* Bacterial cellulose and its potential for biomedical applications. *Biotechnology advances*, v. 53, 2021.

Wang, shan-shan *et al.* Insights into bacterial cellulose biosynthesis from different carbon sources and the associated biochemical transformation pathways in *komagataeibacter* sp. W1. *Polymers*, v. 10, n. 9, 2018.

Xu, chuanhui *et al.* Self-healing chitosan/vanillin hydrogels based on schiff-base bond/hydrogen bond hybrid linkages. *Polymer testing*, v. 66, p. 155–163, 2018.

Zhang, yifeng *et al.* Schizophyllan: a review on its structure, properties, bioactivities and recent developments. *Bioactive carbohydrates and dietary fibre i*, p. 53–71, 2013.

Zhang, zhi hong *et al.* Enhancing mechanical properties of chitosan films via modification with vanillin. *International journal of biological macromolecules*, v. 81, p. 638–643, 2015.

Zhong, kui *et al.* Molecular weight degradation and rheological properties of schizophyllan under ultrasonic treatment. *Ultrasonics sonochemistry*, v. 23, p. 75–80, 2015.

Zou, qin; li, junfeng; li, yubao. Preparation and characterization of vanillin-crosslinked chitosan therapeutic bioactive microcarriers. *International journal of biological macromolecules*, v. 79, p. 736–747, 2015.