

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE
DOUTORADO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOMATERIAL COMPOSTO DE CELULOSE
BACTERIANA E POLISSACARÍDEO FÚNGICO

KETLIN CRISTINE BATISTA MANCINELLI

ORIENTADOR: PROFESSOR DR. GILMAR SIDNEI ERZINGER
COORIENTADORA: PROFESSORA DRA. ANA PAULA TESTA PEZZIN

JOINVILLE – SC

2023

KETLIN CRISTINE BATISTA MANCINELLI

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOMATERIAL COMPOSTO DE CELULOSE
BACTERIANA E POLISSACARÍDEO FÚNGICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde em Meio Ambiente, Doutorado em Saúde e Meio Ambiente, Linha de Pesquisa Polímeros, da Universidade da Região de Joinville (Univille), como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Saúde e Meio Ambiente, sob orientação do professor Dr. Gilmar Sidnei Erzinger e coorientação da professora Dra. Ana Paula Testa Pezzin.

Joinville – SC

2023

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

M269d Mancinelli, Ketlin Cristine Batista
Desenvolvimento de um biomaterial composto de celulose bacteriana e polissacarídeo fúngico / Ketlin Cristine Batista Mancinelli; orientador Dr. Gilmar Sidnei Erzinger; coorientadora Dra. Ana Paula Testa Pezzin. – Joinville: Univille, 2023.

104 f.: il.

Tese (Doutorado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Materiais biomédicos. 2. Esquizofilano. 3. Bacteriologia – Cultura e meios de cultura. 4. Fungos – Cultura e meios de cultura. I. Erzinger, Gilmar Sidnei (orient.). II. Pezzin, Ana Paula Testa (coorient.). III. Título.

CDD 610.284

Termo de Aprovação

“Desenvolvimento de um Biomaterial Composto de Celulose Bacteriana e Polissacarídeo Fúngico”

por

Ketlin Cristine Batista Mancinelli

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger
Orientador (UNIVILLE)

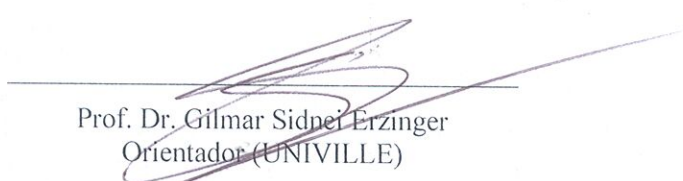
Profa. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Coorientadora (UNIVILLE)

Profa. Dra. Nicole Dalonso
(UNISOCIESC)

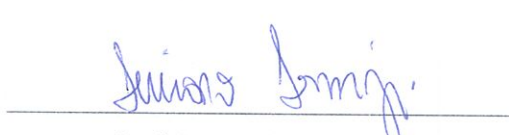
Profa. Dra. Derce de Oliveira Souza Recouvreux
(UFSC)

Profa. Dra. Marcia Luciane Lange Silveira
(UNIVILLE)

Tese julgada para a obtenção do título de Doutora em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.



Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger
Orientador (UNIVILLE)



Prof. Dr. Luciano Lorenzi
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Joinville, 23 de junho de 2023

Dedico este trabalho:

Ao Deus verdadeiro, Senhor que faz o impossível acontecer.

*Ao meu amado esposo Mathias, amigo e presente de Deus em minha vida.
Aos meus pais, Elizabete e Edmilson, que investiram em educação e me ensinaram o
verdadeiro Caminho.*

Às minhas irmãs Kerolin e Karine, por todo amor e palavras de encorajamento.

À todas as mulheres cientistas inspiradoras.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, sem dúvida alguma e de todo meu coração, Ele me conduziu até aqui, meu refúgio e fortaleza.

Ao meu querido esposo Mathias Siebje Mancinelli por acompanhar atento todas as minhas dificuldades encontradas nesta trajetória e me encorajar a prosseguir.

Aos meus queridos pais, Elizabete Francisco Couto e Edmilson Luiz Batista, pelas orações e por sempre acreditarem que seria possível concluir mais esta etapa.

Às minhas irmãs, Kerolin Tuany Batista da Silva e Karine Bianca Batista, pelo incentivo em continuar na caminhada diante dos desafios.

Aos irmãos na fé, por suas orações e palavras amáveis.

Agradeço ao professor Gilmar Sidnei Erzinger pela orientação, assim também agradeço a professora Ana Paula Testa Pezzin pela amizade, orientação e oportunidades.

À professora Regina Gern pela oportunidade de trabalharmos juntas mesmo por um curto período e propiciar o trabalho com fungos.

À professora Márcia Meier (UDESC), por sua generosidade e auxílio na validação de metodologias usadas neste trabalho.

Às amigas Eduarda Zeni, Irlaine Machado e Kamila Regina De Toni, por compartilharem de suas experiências, desabafos e boas conversas.

Aos colegas de laboratório, especialmente as alunas Raiza e Victória Mendes, pelo auxílio no experimental deste trabalho.

Às alunas Sara e Emily, pelo auxílio na utilização do liofilizador (Laboratório NIPol – UDESC).

Às técnicas da UNIVILLE, Aline, Paula e Rizia, pela disponibilidade em ajudar nas práticas de laboratório e troca de ideias.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente e Pesquisa, pelo auxílio no esclarecimento de dúvidas.

À professora Michele Formolo Garcia (UNIVILLE) pelas trocas de experiências em laboratório e sua prontidão em colaborar.

À professora Nicole Dalonso (SOCIESC) pelo auxílio na produção do polissacarídeo fúngico e troca de experiências.

À professora Márcia Lange (UNIVILLE) pelas conversas em laboratório sobre o polissacarídeo fúngico e troca de experiências.

Ao professor Guilherme Sasaki (UFPR) pelas medidas de RMN e CG-MS.

À professora Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz (UFPR) pela medida de massa molar.

À banca examinadora composta pelas professoras Nicole Dalonso, Marcia Luciane Lange Silveira e Derce de Oliveira Souza Recouvreux.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pelo fornecimento do fungo *Schizophyllum commune* e principalmente pela atenção prestada referente ao Acordo de Transferência de Material.

Ao Grupo MCassab que intermediou a adoção do SPG comercial da empresa Contipro.

À Empresa Contipro que forneceu o SPG comercial.

Ao Centro Multiusuário do Centro de Ciências Tecnológicas da Universidade do Estado de Santa Catarina (CMU/CCT/UDESC).

À CAPES, pelo suporte financeiro.

À UNIVILLE pela estrutura física.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

“Em vindo a soberba, sobrevém a desonra, mas com os humildes está a sabedoria”.

*Provérbios 11.2 - **Bíblia Sagrada.***

RESUMO

Na seleção de materiais para aplicações na biomedicina, existe uma demanda crescente por biomateriais multifuncionais de origem natural. Os polissacarídeos naturais derivados de fontes renováveis vêm se destacando por serem biocompatíveis, biodegradáveis e não apresentarem toxicidade. As β -glucanas são polissacarídeos com configurações β no carbono anomérico e podem ser produzidas por bactérias e fungos, apresentando ampla disponibilidade na natureza. Buscou-se neste trabalho desenvolver um biomaterial composto de uma mistura de celulose bacteriana (CB) e esquizofilano (SPG). Desta forma, para produção de membranas de CB, a bactéria *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 foi utilizada. O SPG de *Schizophyllum commune* BRM 060008 foi obtido por cultivo submerso em meio MCM, precipitado com etanol e liofilizado. Biocompósitos foram preparadas pelo método *ex-situ* e por adaptações do método. Com o intuito de melhorar a interação de ambos os polissacarídeos, a CB foi primeiramente amino-funcionalizada com (3-aminopropil) trietoxissilano – APTES e os biocompósitos reticuladas com vanilina. Neste estudo foi possível obter o SPG de uma cepa ainda não utilizada para fins de produção da β -glucana. Os resultados de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear (RMN) confirmaram a produção do polissacarídeo de ligação β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana com ramificação β -(1 $\rightarrow$ 6) de alta massa molar ($1,093 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$) bastante similar ao SPG comercial. A análise termogravimétrica (TGA) revelou uma temperatura máxima de degradação de $\sim 324^\circ\text{C}$ e com massa residual 60% inferior ao SPG comercial. Quanto a modificação química superficial com APTES, os espectros de FTIR de um grupo de amostras comprovaram a modificação da CB pela presença de novas bandas na região aproximada de 1600 cm^{-1} que são características de grupos NH_2 e comprovado pela análise de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS). Entretanto, a segunda metodologia selecionada de modificação com APTES, não foi suficiente para propiciar a bem-sucedida modificação da CB. No desenvolvimento de biocompósitos, dentre as três metodologias testadas, foi possível obter um composto dos polissacarídeos produzidos com adaptações do método, evidenciado por FTIR, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difratometria de raios X (DRX). A terceira metodologia testada de desenvolvimento de biocompósitos (CB-SPG) mostrou-se satisfatória pelas adaptações do método aplicado, visto por FTIR, pela presença de bandas características do SPG em matriz de CB. Contudo, novas análises devem ser avaliadas a fim de qualificar o biocompósito para aplicação na biomedicina.

Palavras-chave: celulose bacteriana, esquizofilano, celulose bacteriana amino-funcionalizada

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A BIOMATERIAL COMPOSED OF BACTERIAL CELLULOSE AND FUNGAL POLYSACCHARIDE

There is a growing demand for multifunctional biomaterials of natural origin in selecting materials for biomedical applications. Natural polysaccharides derived from renewable sources have been highlighted as biocompatible, biodegradable, and non-toxic. β -glucans are polysaccharides with β configurations on the anomeric carbon and can be produced by bacteria and fungi, being wide availability in nature. The aim of this work was to develop a biomaterial based on bacterial cellulose (BC) and schizophyllan (SPG). Thus, the bacterium *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 was cultivated. The SPG of *Schizophyllum commune* BRM 060008 was obtained by submerged cultivation in MCM medium, precipitated with ethanol, and freeze-dried. Biocomposites were prepared by the *ex-situ* method and by method adaptations. In order to improve the interaction of both polysaccharides, BC was firstly amine-functionalized with (3-aminopropyl) triethoxysilane - APTES and the biocomposites cross-linked with vanillin. In this study, obtaining the SPG of a strain not yet used for the production of β -glucan was possible. The results of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and nuclear magnetic resonance (NMR) confirmed the production of β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucan with β -(1 $\rightarrow$ 6)-branching with high molar mass (1.093×10^6 g mol⁻¹) very similar to the commercial SPG. Thermogravimetric analysis (TGA) revealed a maximum degradation temperature of ~ 324 °C and a residual mass 60% lower than the commercial SPG. As for surface chemical modification with APTES, the FTIR spectra of a group of samples confirmed the modification of the CB by the presence of new bands around 1600 cm⁻¹ attributed amino groups (NH₂) and confirmed by the analysis of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). However, the second selected methodology of modification with APTES was not enough to provide the successful modification of the BC. In the development of biocomposites, among the three methodologies tested, it was possible to obtain a compound of the polysaccharides produced with adaptations of the method, evidenced by FTIR, scanning electron microscopy (SEM), and X-ray diffraction (XRD). The third methodology tested for the development of biocomposites (CB-SPG) proved satisfactory due to the adaptations of the applied method, confirmed by FTIR, due to the presence of characteristic bands of SPG in a CB matrix. However, new analyzes must be evaluated in order to qualify the biocomposite for biomedical application.

Keywords: bacterial cellulose, schizophyllan, amine-functionalized BC

RESUMEN

DESARROLLO DE UN BIOMATERIAL COMPUESTO POR CELULOSA BACTERIANA Y POLISACÁRIDO FÚNGICO

En la selección de materiales para aplicaciones biomédicas, está creciendo la demanda de biomateriales multifuncionales de origen natural. Los polisacáridos naturales derivados de fuentes renovables se destacan por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y falta de toxicidad. Los β -glucanos son polisacáridos con configuraciones β en el carbono anomérico y pueden ser producidos por bacterias y hongos, y se encuentran ampliamente disponibles en la naturaleza. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un biomaterial compuesto por una mezcla de celulosa bacteriana (CB) y esquizofilano (SPG). Para la producción de membranas de BC, se utilizó la bacteria *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769. El SPG de *Schizophyllum commune* BRM 060008 se obtuvo mediante cultivo sumergido en medio MCM, y posteriormente se precipitó con etanol y liofilizó. Los biocompuestos se prepararon utilizando el método *ex situ* y sus variantes. Con el fin de mejorar la interacción entre ambos polisacáridos, primero se funcionalizó la CB con (3-aminopropil) trietoxisilano - APTES, y luego se reticularon los biocompuestos con vainillina. En este estudio, se logró obtener el SPG de una cepa que aún no se había utilizado previamente para la producción de β -glucano. Los resultados de la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y la resonancia magnética nuclear (RMN) confirmaron la producción del polisacárido de glucano β -(1 $\rightarrow$ 6) ramificado β -(1 $\rightarrow$ 6) de alta masa molar ($1,093 \times 10^6$ g mol⁻¹), muy similar al SPG comercial. El análisis termogravimétrico (TGA) reveló una temperatura máxima de degradación de aproximadamente 324 °C y una masa residual un 60 % inferior a la del SPG comercial. En cuanto a la modificación química superficial con APTES, los espectros FTIR de un grupo de muestras confirmaron la modificación de la CB debido a la presencia de nuevas bandas en la región aproximada de 1600 cm⁻¹, las cuales son características de los grupos NH₂. Estas modificaciones también fueron confirmadas mediante el análisis de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS). Sin embargo, la segunda metodología seleccionada para la modificación con APTES no fue suficiente para lograr una modificación exitosa del BC. En el desarrollo de los biocompuestos, de las tres metodologías probadas, fue posible obtener un compuesto de los polisacáridos producidos mediante adaptaciones del método. Esto se evidenció mediante FTIR, microscopía electrónica de barrido (SEM) y difracción de rayos X (XRD). La tercera metodología probada para el desarrollo de los biocompuestos (CB-SPG) resultó satisfactoria debido a las adaptaciones aplicadas al método, como se pudo observar en FTIR, debido a la presencia de bandas características del SPG en una matriz de CB. No obstante, es necesario llevar a cabo nuevos análisis para evaluar la idoneidad del biocompuesto en aplicaciones biomédicas.

Palabras clave: celulosa bacteriana, esquizofilano, CB amino-funcionalizada

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Cultura do fungo <i>S. commune</i> BRM 060008 em meio PDA	30
Figura 2 – Tripla hélice do SPG (discos hachurados – moléculas de D-glucose da cadeia lateral; o cilindro central – núcleo da hélice. Os discos, juntamente com as moléculas de água intervenientes formam uma cadeia helicoidal indicada pela linha tracejada).....	32
Figura 3 - Estrutura da celulose: A) Estrutura molecular da celulose e B) Unidade de repetição da celulose (celobiose) - entre parênteses	36
Figura 4 – Ligações de hidrogênio na celulose: intramolecular (----) e intermolecular (---)	36
Figura 5 - Esquema de montagem de microfibrilas de celulose por <i>K. xilinus</i> e micrografia de MEV mostrando uma estrutura de rede de nanofibras.....	37
Figura 6 - Estudo de caso com a membrana Bionext® em queimadura de segundo grau	38
Figura 7 – Esquema representando métodos de modificação da CB: A) Modificação <i>in-situ</i> e B) Modificação <i>ex-situ</i>	40
Figura 8 - Procedimento geral para grafitização química da CB usando APS; Imagens das membranas de CB e sua flexibilidade antes e depois da modificação química	44
Figura 9 - Grafitação de porções de aminosilano na superfície da CB (CBA)	46
Figura 10 – Representação da reação de base de Schiff entre polímeros contendo amino e grupos aldeído.....	47
Figura 11 – Reações de reticulação possíveis no caso do agente de reticulação vanilina com a celulose; destaque para a reação de base de Schiff.....	48
Figura 12 – Esquema mostrando as possíveis ligações no caso do agente de reticulação vanilina com a quitosana e formação de hidrogel	49
Figura 13 – Micélio fúngico de <i>S. commune</i> BRM 060008 em meio PDA (14 dias)	54
Figura 14 – Procedimento de produção do EPS de <i>S. commune</i>	55
Figura 15 - Procedimento de produção do EPS dialisado de <i>S. commune</i>	56
Figura 16 – Produção de EPS a partir de diferentes linhagens de <i>S. commune</i> ; destaque para diferentes linhagens em roxo	60
Figura 17 – Espectro de FTIR dos exopolissacarídeos de <i>S. commune</i> de SPG, SPG-s-D e SPG-D; destaque para a banda em torno de 890 cm^{-1} (seta)	62
Figura 18 – Espectros de RMN- ^{13}C dos polissacarídeos de <i>S. commune</i> : A) SPG e B) SPG-D (em detalhe - ^{13}C -DEPT)	63

Figura 19 – Espectros de HSQC dos polissacarídeos de <i>S. commune</i> : A) SPG e B) SPG-D	64
Figura 20 – Curvas TG e DTG dos polissacarídeos SPG, SPG-s-D e SPG-D.....	65
Figura 21 – Etapas de produção das membranas de CB	69
Figura 22 - Metodologias de modificação química superficial de membranas de CB com APTES.....	71
Figura 23 – Desenvolvimento dos biocompósitos: A) Metodologias 1; B) Metodologias 2 e C) Metodologia 3.....	75
Figura 24 - Espectros de FTIR da CB (a), CBA P3 (b), CBA-SPG-VA (1) – lado 1, (c) e CBA-SPG-VA (1) – lado 2 (d).....	79
Figura 25 - Espectros de FTIR da A) CB (a), CBA P9 (b), CBA-SPG-VA (2) – lado 1 (c), CBA-SPG-VA (2) – lado 2 (d) e B) CB (a), CBA P9 (b), CBA-SPG-D-VA (2) – lado 1 (c), CBA-SPG-D-VA (2) – lado 2 (d)	80
Figura 26 - Espectros de FTIR da A) CB (a), CB-SPG – lado 1 (b) CB-SPG – lado 2 (c) e B) CB, SPG e CB-SPG.....	81
Figura 27 – Espectros XPS das membranas de CB, CBA P3 e CBA P9	82
Figura 28 – Método da gota sésil para a medida de AC das amostras: A) CBA P3 e B) CBA P9.....	83
Figura 29 – Micrografias de MEV de superfície de CB e CBA com aumento de 10.000×: A) CB, B) CBA P3, C) CBA P9, D) CBA-SPG-VA (1), E) CBA-SPG-VA (2) e F) CBA-SPG-D-VA (2).....	86
Figura 30 - Difractogramas de raios de X: A) CB (a), CBA-SPG-VA (1) (b), SPG (c) e B) CB (a), CBA-SPG-VA (2) (b), CBA-SPG-D-VA (2) (c), SPG (d), SPG-D (e).....	87
Figura 31 – Curvas TG/DTG das membranas: A) CB, CBA P3 e CBA-SPG-VA (1); B) CB, CBA P9, CBA-SPG-VA (2) e CBA-SPG-D-VA (2) e C) CB e CB-SPG	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Algumas β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanas com conformação tripla hélice solúveis em água	29
Table 2 - Análise dos derivados parcialmente O-metilados de SPG, SPG-s-D e SPG-D	64
Tabela 3 – Concentração atômica de elementos (%) da análise de XPS da superfície de membranas de CB e CB modificadas	83
Tabela 4 – Principais dados obtidos das curvas TG/DTG da CB, CB amino-funcionalizadas e biocompósitos	90

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	– Ângulo de contato
AGU	– Unidade de anidroglicose
A-g-CB	– Celulose amino-grafitizada
APTES	– (3 aminopropil) trietoxissilano
BG	– β -glucana
CB	– Celulose bacteriana
CBA	– Celulose bacteriana amino-funcionalizada
CG-MS	– Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa
Cip	– Ciprofloxacina
D	– Diálise
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DP	– Grau de polimerização
DRX	– Difractometria de raios X
Dspol	– Polissacarídeo solúveis em DMSO
EDX	– Energia dispersiva de raios X
EPS	– Exopolissacarídeo
FTIR	– Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
HSQC	– Heteronuclear single-quantum correlation
HPSEC	– Cromatografia líquida de alta performance por exclusão de tamanho
MEV	– Microscopia eletrônica de varredura
M _w	– Massa molar ponderal média
M _n	– Massa molar numérica média
NK	– Células <i>natural Killer</i>
ON	– Óxido nitroso
PDA	– Ágar batata dextrose
PLGA	– Poli(ácido láctico-co-glicólico)
PVA	– Poli(álcool vinílico)
RMN	– Ressonância magnética nuclear
RSM	– Método de superfície de resposta
SPG	– Esquizofilano
SPG-D	– Esquizofilano dialisado

TGA – Análise termogravimétrica

TG/DTG – Curvas de termogravimetria/termogravimetria derivada

VA – Vanilina

XPS – Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

MCM – Meio de Cultura Mínimo

Glc_p – Glucose piranosídica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivo Específicos	22
3 CAPÍTULO 1 – REVISÃO DA LITERATURA	24
3.1 Polissacarídeos	24
3.2 β-(1→3)-D-glucana.....	27
3.2.1 Esquizofilano (SPG) – Origem, estrutura, propriedades gerais e aplicações	30
3.3 Celulose bacteriana (CB) – Origem, estrutura, propriedades gerais e aplicações	34
3.3.1 Modificação <i>ex-situ</i> da CB	39
3.3.2 Modificação química superficial da CB com aminosilanos	43
3.3.3 Método de reticulação química com aldeído - Reação de base de Schiff	46
3.4 Polissacarídeos em curativos	50
4 CAPÍTULO 2- PRODUÇÃO DO POLISSACARÍDEO FÚNGICO DE <i>SCHIZOPHYLLUM COMMUNE</i>.....	54
4.1 Materiais e métodos.....	54
4.1.2 Manutenção do microrganismo e produção do EPS de <i>S. commune</i>	54
4.1.3 Estimativa da produção de biomassa e consumo de glucose.....	55
4.1.4 Produção de EPS de <i>S. commune</i> da amostra dialisada.....	55
4.1.5 Caracterização do EPS de <i>S. commune</i>	56
4.1.5.1 Análise de determinação de estrutura dos polissacarídeos	56
4.1.5.2 Metilação	57
4.1.5.3 Análise de Massa Molar do SPG-D.....	58
4.1.5.4 Análise de estabilidade térmica	58
4.2 Resultados e Discussão	58
4.2.1 Rendimento do EPS de <i>S. commune</i>	58
4.2.2 Caracterização do EPS de <i>S. commune</i> por FTIR, RMN, CG-MS e HPSEC	61
4.2.3 Análise termogravimétrica (TGA).....	65
4.3 Conclusões	66

5 CAPÍTULO 3 - MODIFICAÇÃO QUÍMICA SUPERFICIAL DA CELULOSE BACTERIANA (CB) COM (3-AMINOPROPIL) TRIETOXISILANO (APTES) E PREPARAÇÃO DE BIOCOMPÓSITOS	68
5.1 Materiais e métodos.....	68
5.1.1 Materiais	68
5.1.2 Produção de CB	68
5.1.3 Modificação química superficial da CB com APTES	70
5.1.4 Incorporação de SPG e SPG-D em membranas de CB e CBA e reticulação com vanilina (VA).....	74
5.1.5 Caracterização	76
5.1.5.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	76
5.1.5.2 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)	76
5.1.5.3 Ângulo de contato (AC)	76
5.1.5.4 Difratomia de Raios X (DRX)	76
5.1.5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	77
5.1.5.6 Análise termogravimétrica (TGA).....	77
5.2 Resultados e Discussão	77
5.2.1 Análise estrutural por FTIR.....	77
5.2.2 Análise XPS.....	82
5.2.3 Ângulo de contato (AC)	83
5.2.4 Análise morfológica por MEV	84
5.2.5 Análise por DRX	86
5.2.6 Análise termogravimétrica (TGA).....	87
5.3 Conclusões	90
6 CONCLUSÕES FINAIS	90
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	93
REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos são macromoléculas poliméricas de carboidratos com unidades de monossacarídeos ligados covalentemente por ligações glicosídicas, em uma configuração linear ou ramificada (YANG; ZHANG, 2009). Assim como outras macromoléculas biológicas, estes polímeros estão intimamente ligados a papéis essenciais nas atividades de vida de todos os organismos conhecidos (MENG *et al.*, 2020). Sabe-se que alguns polissacarídeos podem atuar como potentes imunomoduladores (SINDHU *et al.*, 2021; TZIANABOS, 2000), sendo capazes de impactar positivamente o sistema imune pela interação com as células T, leucócitos, monócitos e macrófagos, além de possuírem propriedades antitumorais. Polissacarídeos com propriedades antitumorais já se encontram disponíveis em países como Japão e Índia (SINDHU *et al.*, 2021). Dentre os polissacarídeos estudados, as β -glucanas são amplamente descritas como modificadores da resposta biológica (DALONSO; GOLDMAN; GERN, 2015; MAJTAN; JESENAK, 2018; MENG *et al.*, 2020; VETVICKA, 2011).

As β -glucanas podem ser produzidas extracelularmente e secretadas por microrganismos, por este motivo são conhecidas como exopolissacarídeos (EPS). Um exemplo é o EPS fúngico chamado de esquizofilano (SPG). O SPG é produzido pelo basidiomiceto *Schizophyllum commune* e consiste de unidades de β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucana na cadeia principal e β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucosil na cadeia lateral, a cada três unidades de glucose da cadeia principal (RAU *et al.*, 1992). Este SPG adota naturalmente uma estrutura em tripla hélice que é essencial para a atividade antitumoral contra sarcoma 180 (ZHONG *et al.*, 2013). 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 um polissacarídeo eficaz contra infecções e tumores (CARVALHO *et al.*, 2021). É um biopolímero importante que tem chamado muita atenção por suas 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 é empregado em produtos cosméticos para a pele com diversos benefícios, dentre os quais, impulsionador da imunidade da pele, ajuda na inflamação crônica, efeito calmante, suporte da barreira cutânea, excelente para peles

sensíveis propensas a eczema, combate a inflamação, reduz as rugas, efeito antipoluição, suporte ao microbioma da pele (CONTIPRO, 2022, web).

A celulose bacteriana (CB) também é um polissacarídeo extracelular (CHAWLA *et al.*, 2009). A biossíntese da CB ocorre quando as bactérias polimerizam resíduos de glucose em cadeias lineares de β -(1 $\rightarrow$ 4)-glucana (CZAJA *et al.*, 2006). Algumas das principais vantagens da CB são a sua estrutura porosa, composta por nanofibrilas, 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 melhor cicatrização, mas não possui atividade antimicrobiana a fim de prevenir as possíveis infecções (LIYASKINA *et al.*, 2018; MANEERUNG; TOKURA; RUJIRAVANIT, 2008; BARUD *et al.*, 2016).

Estratégias a fim de superar os pontos fracos da CB e ampliar sua área de aplicação vêm sendo largamente estudadas e, uma das alternativas consiste em combinar a CB com outros materiais (plastificantes, polímeros solúveis em água, extratos naturais e agentes antimicrobianos) pelo método de modificação conhecido como *ex-situ* (CAZÓN; VÁZQUEZ, 2021). Na modificação *ex-situ*, a CB é modificada por tratamento químico ou pela absorção de outros materiais após a membrana já formada (STUMPF *et al.*, 2018). Diferentes biopolímeros vêm sendo misturados pelo método *ex-situ* com a CB para melhorar suas propriedades biológicas e funcionais. A combinação da CB com diferentes biopolímeros pode ser alcançada por mistura física, grafatização química ou pelo uso de agente de reticulação (WAHID *et al.*, 2021). Alguns exemplos de biopolímeros misturados com a CB são a quitosana (CACICEDO *et al.*, 2020) e a dextrana (LIN *et al.*, 2017).

Um exemplo é o trabalho de Hamedi *et al.* (2020), em que os pesquisadores desenvolveram um novo hidrogel combinado pelos biopolímeros de 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)triétoxissilano (APTES) e o compósito reticulado com glutaraldeído. Em relação a atividade antibacteriana, o compósito de CB amino-

funcionalizada/SPG não inibiu o crescimento bacteriano significativamente, mostrando efeito inibitório de 50% e 30% contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Entretanto, esses resultados considerados moderados podem ser aprimorados pela adição de agentes antibacterianos. Em outro estudo, Hamedi e Shojaosadati (2021) incorporaram nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) na mistura de CB amino-funcionalizada/SPG para promover aumento da atividade antibacteriana, e atingiram efeito inibitório de 90% e 70% contra *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente.

Com base nos resultados observados em pesquisas anteriores, o presente estudo buscou desenvolver, pelo método *ex-situ* de misturas, assim como, pelo uso de um agente de reticulação diferente do comumente utilizado, um material com propriedades aliadas de cada biopolímero separadamente. Além disso, neste estudo também foi comparada as características do SPG de *S. commune* de uma nova linhagem não relatada ainda na literatura na produção de SPG com o polissacarídeo comercialmente disponível.

Dentro deste contexto, o presente trabalho se justifica pelas inúmeras propriedades benéficas de ambos os biopolímeros na área da saúde. Além disso, polímeros extracelulares apresentam um largo campo de aplicações, incluindo seu uso na cura e cicatrização de feridas. Do ponto de vista ambiental, os biopolímeros produzidos são de origem natural, sustentáveis e biodegradáveis. No que se refere a área de materiais, os biopolímeros são complementares, uma vez que a CB pode ser obtida por culturas estáticas que produzem uma membrana de celulose na interfase líquido/ar (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991), e o SPG pode ser extraído da cultura precipitada (pela adição gradual de etanol 96%) de *S. commune*, porém apresenta baixa capacidade de formação de filme (HAMED I *et al.*, 2020). Ao modificar e combinar a CB com outro biopolímero, o biomaterial resultante pode apresentar propriedades superiores e suplantando algumas limitações.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver biocompósitos a partir de CB e SPG visando aplicações como um biomaterial

2.2 Objetivo Específicos

- Produzir e caracterizar o exopolissacarídeo SPG utilizando fungo *Schizophyllum commune* BRM 060008;
- Produzir membranas de CB utilizando a bactéria *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769;
- Funcionalizar a CB com aminosilano, (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES), para obter melhor interação entre CB e SPG;
- Incorporar o SPG na membrana de CB utilizando um agente de reticulação “verde”;
- Caracterizar as amostras dos biopolímeros puros e das misturas obtidas quanto as suas propriedades morfológicas, físicas e químicas.

CAPÍTULO 1

Revisão da Literatura

3 CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são polímeros de carboidratos formados por reações de condensação de monossacarídeos por meio de ligações hemiacetais ou hemicetais. Os polissacarídeos também existem como sequências curtas de oligossacarídeos ou unidades de repetição poliméricas ligadas a outras biomoléculas para formar glicoproteínas, lipopolissacarídeos, ácidos teicóicos e ácidos nucleicos (RAMESH; THARANATHAN, 2003). Compostos de vários monossacarídeos, os polissacarídeos são ligados por diferentes ligações glicosídicas, apresentando estruturas lineares ou até mesmo hiper ramificadas. Alguns polissacarídeos isolados de fontes naturais apresentam diversas atividades biológicas importantes (antitumoral, imunomoduladora e anti-inflamatória) que são grandemente afetadas por suas estruturas químicas e conformações em cadeia (YANG; ZHANG, 2009).

Essas biomacromoléculas desempenham inúmeras funções benéficas e possuem uma ampla gama de aplicações industriais que estão intimamente relacionadas às suas características estruturais. O conhecimento estrutural de cada polissacarídeo individualmente é a base teórica para o entendimento da relação estrutura-função do polissacarídeo. Em comparação com outras macromoléculas biológicas, a estrutura do polissacarídeo é muito mais complexa devido à diversidade de unidades monoméricas e tipos de ligação envolvidas (HONG *et al.*, 2021).

Os polissacarídeos são amplamente encontrados na natureza com diferentes origens, incluindo algas, plantas, animais, bactérias e fungos. São sintetizados com distintas funções, como a função de armazenamento de energia em plantas (amido) e suporte estrutural de células vegetais (celulose) (TORRES; ARROYO; TRONCOSO, 2019). Depois das proteínas e dos ácidos nucleicos, os polissacarídeos naturais são as biomacromoléculas mais abundantes encontradas na natureza (MENG *et al.*, 2020).

Diversos polissacarídeos isolados de algas, cogumelos, leveduras e plantas superiores vêm atraindo a atenção das áreas de nutrição e da medicina em função de suas características como baixa toxicidade, raros efeitos colaterais negativos, custo relativamente baixo e amplo espectro de ações terapêuticas (KOROLENKO; BGATOVA; VETVICKA, 2019). Biopolímeros de polissacarídeos vêm se tornando cada

vez mais conhecidos como materiais modernos para curativos de feridas uma vez que são de origem natural, altamente abundantes, de baixo custo, absorventes, não tóxicos e não imunogênicos (ADUBA Jr; YANG, 2017).

No que se refere aos principais polissacarídeos usados em aplicações biomédicas, alguns se destacam, como a celulose, alginatos, glicosaminoglicanos, quitina e quitosana, polissacarídeos marinhos e polissacarídeos sulfatados artificialmente (modificados) (SOUZA *et al.*, 2021). Os polissacarídeos derivados de microrganismos também apresentam grande potencial para aplicações farmacêuticas e biomédicas (LI *et al.*, 2018), sendo alguns deles produzidos comercialmente, como no caso da xantana e dextrana (REHM, 2010; SUTHERLAND, 1998) e a CB aplicada a curativos (PICHETH *et al.*, 2017).

Além de aplicações biomédicas, devido à versatilidade e biodegradabilidade, alguns polissacarídeos são amplamente utilizados nas indústrias de embalagens, alimentos e produtos farmacêuticos como materiais sustentáveis e renováveis (TORRES; ARROYO; TRONCOSO, 2019). Na indústria de embalagens de alimentos, polissacarídeos vêm sendo utilizados para criar revestimentos e filmes comestíveis para reduzir as embalagens plásticas tradicionais. Polímeros comestíveis naturais são feitos de constituintes comestíveis naturais que podem ser consumidos por animais ou seres humanos sem risco para a saúde. Além disso, os polímeros petroquímicos, amplamente utilizados para embalagens de alimentos, não são renováveis e biodegradáveis e ao final de seu tempo de vida útil necessitam de aterros sanitários e contaminam o meio ambiente (MOHAMED; EL-SAKHAWY; EL-SAKHAWY, 2020).

O polissacarídeo mais abundante na Terra é a celulose, formada a partir de unidades repetidas de β -D-glucopiranosose covalentemente ligadas por funções acetais entre o grupo hidroxila (OH) equatorial do átomo de carbono 4 (C4) e o átomo de carbono 1 (C1). Esse polissacarídeo é o principal constituinte da parede celular das plantas, uma matéria-prima praticamente inesgotável (KLEMM *et al.*, 2005) e seu conteúdo em fibras e plantas depende das diferentes fontes naturais (GUIMARÃES *et al.*, 2009). Segundo Chandra e Rustgi (1998) muitos pesquisadores da área de polímeros consideram que a química destes materiais teve sua origem na caracterização da celulose, que foi isolada pela primeira vez há cerca de 150 anos. A celulose, obtida a partir das paredes celulares das plantas, é isolada em microfibrilas por extração química. Em todas as formas, a celulose é um polímero altamente cristalino e de alta massa molar, infusível e insolúvel em todos os solventes que quebram as ligações de hidrogênio, exceto os mais

agressivos. Por causa de sua infusibilidade e insolubilidade, este biopolímero é geralmente convertido em derivados para torná-lo mais processável. É um excelente substituto para polímeros não renováveis à base de petróleo e é considerado uma matéria-prima inesgotável (GOPI *et al.*, 2019).

A celulose pode ser também biosintetizada por microrganismos, como por exemplo o gênero *Komagataeibacter* (denominada anteriormente como *Acetobacter* e *Gluconacetobacter*) (CACICEDO *et al.*, 2016). Embora com a mesma estrutura química da celulose vegetal, as propriedades da CB são bastante diferentes, especialmente em relação a ultrafina rede de arquitetura, alta hidrofilicidade e moldabilidade durante formação (KLEMM *et al.*, 2001). Além disso, a celulose vegetal é produzida como um polímero lignocelulósico, fortemente associada a lignina, a hemicelulose e outras substâncias, já a CB apresenta elevada pureza (KLEMM *et al.*, 2001). A CB é considerada um material não citotóxico, não genotóxico e altamente biocompatível, atraindo interesse em diversas áreas, como em aplicações biomédicas (GORGIEVA; TRČEK, 2019).

De forma geral, os polissacarídeos podem ser divididos em três grupos de acordo com sua localização morfológica, o primeiro como polissacarídeo intracelular, localizado dentro ou como parte da membrana citoplasmática; o segundo como polissacarídeo de parede celular, formando parte estrutural da parede celular; e por fim, o polissacarídeo extracelular, localizado fora da parede celular (WILKINSON, 1958). Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de carboidratos extracelulares produzidos e secretados por microrganismos que acumulam esses polissacarídeos fora das células. Apesar de sua composição monomérica similar a produtos de animais e plantas, os EPS de diferentes origens microbianas (bactérias e fungos) apresentam uma larga variedade de combinações estruturais que proporcionam suas propriedades únicas. Além disso, são facilmente obtidos de recursos renováveis, são biocompatíveis e aparentemente não tóxicos (MOSCOVICI, 2015). Esses EPS podem ser encontrados no meio extracelular na forma de uma “matriz gelatinosa” amorfa. Nos ambientes naturais onde são encontrados, tais polímeros podem estar associados à virulência, como no caso de patógenos vegetais ou animais, com interações microbianas vegetais ou mesmo protegendo a célula microbiana contra a dessecação ou ataque de bacteriófagos e protozoários (SUTHERLAND, 1998).

A CB é considerada um polissacarídeo extracelular, ou seja, um EPS (CHAWLA *et al.*, 2009). Outro EPS é o esquizofilano (SPG) produzido pelo basidiomiceto *Schizophyllum commune*. O SPG é um homopolissacarídeo de glucose que consiste em

resíduos de β -1,3-D-glucose ligados linearmente formando a cadeia principal, com uma cadeia lateral de β -1,6-D-glucose a cada três resíduos da cadeia principal (KUMAR; SINGHAL, 2011; ZHANG *et al.*, 2013).

Os polissacarídeos apresentam estruturas diversas variando no tipo de monômeros de açúcares. Os cogumelos por exemplo, apresentam uma ampla gama de polissacarídeos, não somente D-glucanas, mas também uma classe de polímeros mais complexos, chamados de heteropolissacarídeos (RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2016). Alguns EPS fúngicos baseados no tipo de monômeros podem ser galactomananas, xilomananas, glucomananas, quitina e quitosana, entre outros (HAMIDI *et al.*, 2022).

Entre os polissacarídeos, as glucanas são uma classe importante de biopolímeros de D-glucose, que podem apresentar distintas configurações da estrutura anomérica das unidades de D-glucopyranose (D-Glcp), incluindo α -D-glucose, β -D-glucose e configurações mistas. Esses polissacarídeos podem ser diferenciados ainda com base nas posições das ligações glicosídicas ou massa molar (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Nos cogumelos comestíveis, as D-glucanas apresentam estruturas químicas diversificadas, sendo o tipo mais comum composto de uma cadeia principal de β -D-glucose (1 $\rightarrow$ 3)-ligada frequentemente em O-6 por moléculas de β -D-glucose como cadeias laterais (RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2015).

3.2 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucana

β -glucana é um nome químico de uma variedade de polímeros de β -glucose que diferem no tipo de ligação glicosídica. Existe uma variedade desses polímeros, incluindo a celulose, que é uma (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucana (NOVAK; VETVICKA, 2008). Nos fungos especificamente, as glucanas são os polissacarídeos mais abundantes, sendo os polissacarídeos com ligação β -(1 $\rightarrow$ 3) os mais importantes. Alguns destes polissacarídeos são intracelulares, outros, são secretados para o meio e a maioria deles são constituintes importantes da parede celular (RUIZ-HERRERA, 1991).

Entre uma variedade de imunomoduladores até então conhecidos e testados, os polissacarídeos isolados de várias fontes naturais ocupam uma posição de destaque, entre eles os polissacarídeos homopolímeros de β -glucose, incluindo β -glucanas que apresentam cadeias lineares com ligação (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glicosídica ou ramificações contendo adicionalmente ligação (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glicosídica (NOVAK; VETVICKA, 2008; VETVICKA, 2011). As (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucanas que apresentam unidades β -D-

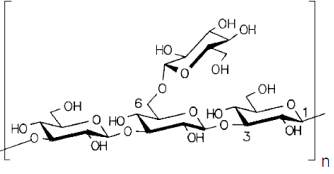
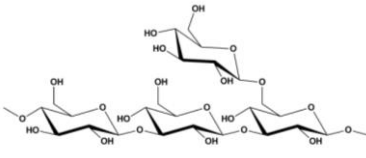
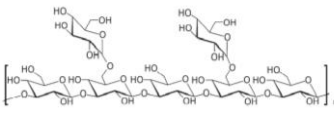
glucopiranosil ligados com ligações (1→6) como ramificações unitárias, aumentam sistematicamente o sistema imune, resultando em atividades antitumorais, antibacterianas, antivirais, anticoagulantes e cicatrizantes, sendo a cadeia principal (1→3)- β -D-glucana essencial (BOHN; BEMILLER, 1995). Os polissacarídeos de fungos basidiomicetos lentinan e esquizofilano, são exemplos de polissacarídeos com propriedades anticâncer (LEMIESZEK; RZESKI, 2012), usados como agentes imunoterapêuticos, em conjunto com quimioterapia ou radioterapia, para o tratamento do câncer no Japão desde 1986 (MENG *et al.*, 2020; BOHN; BEMILLER, 1995).

A conformação das β -glucanas desempenham um papel crucial em suas atividades biológicas (WANG *et al.*, 2017) que geralmente dependem da composição química, da configuração em cadeia e das propriedades físicas. Para β -D-glucanas com estrutura em tripla hélice, as atividades biológicas ainda se distinguem com base na razão de ramificação, massa molar ponderal média (M_w) e influência de conformação das cadeias poliméricas. Desta forma, as glucanas com ligações β -(1→3) não são todas iguais, pois diferenças na massa molar e estrutura da cadeia lateral são importantes determinantes de propriedades físicas, como a solubilidade. Em contraste ao SPG (solúvel em água), outra β -(1→3)-glucana, a curdlana; é um polímero de alta massa molar que não possui cadeia lateral e, como consequência, apresenta solubilidade limitada em água a temperatura ambiente (ZHANG *et al.*, 2002).

Geralmente os grupos hidroxila do Carbono 6 (C6) nas cadeias laterais exibem mais agilidade para se associar com água do que nas cadeias principais devido ao impedimento estérico (XU; XU; ZHANG, 2012). Desta forma, entende-se que a hidroxila da cadeia lateral se associa facilmente aos aglomerados de água, levando a uma boa dissolução em solução aquosa (OKOBIRA *et al.*, 2008).

Na Tabela 1 estão alguns exemplos de β -(1→3)-glucanas solúveis em água que apresentam conformação em tripla hélice.

Tabela 1 - Algumas β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanas com conformação tripla hélice solúveis em água

Nome	Origem fúngica	Estrutura química	Ref.
Esquizofilano	<i>Schizophyllum commune</i>		(RAU, 1999; YANAKI <i>et al.</i> , 1983)
Scleroglucana	<i>Sclerotium rolfsii</i>		(SCHMID; MEYER; SIEBER, 2011)
Lentinan	<i>Lentinula edodes</i>		(MIZUNO; NISHITANI, 2013)

Outra questão relevante que pode influenciar a formação de tripla hélice está relacionada a M_w . Yanaki *et al.* (1983) em seu estudo sobre a correlação da atividade antitumoral do SPG e sua conformação em tripla hélice em solução aquosa mostraram que o SPG com $M_w = 9 \times 10^4$ em água apresentou-se como triplas hélices rígidas, porém quando a massa molar foi reduzida, abaixo de $M_w = 9 \times 10^4$, coexistiram na solução a formação de tripla hélice e cadeia simples. Já quando a M_w foi reduzida para 5×10^3 , foram observadas apenas cadeias simples. Os autores ainda observaram que à medida que a M_w diminui, a razão de inibição do tumor Sarcoma 180 também foi reduzida. Assim, os autores concluíram que o potencial antitumoral do SPG em água está relacionado à quantidade de triplas hélices em relação a cadeias simples. Ainda neste estudo observou-se que a sonicação extensiva pode enfraquecer as ligações de hidrogênio entre as cadeias da tripla hélice. Quando a M_w da amostra processada for inferior a um determinado valor, a tripla hélice será decomposta em cadeias simples. Assim, a potência e o tempo do ultrassom devem ser controlados quando os polissacarídeos forem processados por esta técnica.

Meng *et al.* (2020) explicam que existe relação entre M_w e bioatividade sendo que, geralmente, os polissacarídeos com maior M_w exibem maior atividade. Entretanto, quando se trata de β -glucanas com tripla hélice, esta relação pode ser diferente e pode variar de acordo com o tipo de polissacarídeo, mas os autores acreditam que quando a M_w é relativamente mais baixa, as atividades anticancerígenas são mais altas de forma geral.

Porém, se a M_w for muito baixa, como no caso citado acima de Yanaki *et al.* (1983), a bioatividade também diminuirá.

3.2.1 Esquizofilano (SPG) – Origem, estrutura, propriedades gerais e aplicações

O SPG pode ser produzido pelo cultivo submerso do fungo *S. commune*, utilizando meio de cultivo composto de: glucose 3,0%; 0,3% extrato de levedura; 0,15% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0,1% KH_2PO_4 ; 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e pH 4,8. Esse polissacarídeo pode ser precipitado de culturas filtradas de 4-8 dias e concentrado a 35%-45% pela adição de solventes orgânicos miscíveis em água, como o metanol (KIKUMOTO *et al.*, 1970) e etanol (MOHAMMADI *et al.*, 2018). Um meio comumente citado na literatura é descrito por Rau *et al.* (1992) sendo composto de: 30 g L^{-1} de glucose, 3 g L^{-1} de extrato de levedura; 1 g L^{-1} de KH_2PO_4 e 0,5 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e pH 5,3. O polissacarídeo produzido pelo fungo *S. commune* se separa espontaneamente do micélio e migra livremente para a fase líquida (meio de cultivo). Frequentemente a literatura traz como meio de manutenção da cultura de *S. commune* o meio ágar batata dextrose (PDA) com incubação de 7 dias a 28 °C (JAMSHIDIAN *et al.*, 2016; KUMARI; SURVASE; SINGHAL, 2008; MOHAMMADI *et al.*, 2018), também se encontra incubação a 29 °C por 7 dias ou até o micélio atingir a borda da placa de Petri (SMIRNOU *et al.*, 2017). Na Figura 1 é apresentada a cultura de *S. commune* BRM 060008 em meio PDA. O basidiomiceto *S. commune* é um fungo filamentoso de madeira apodrecida (RAU *et al.*, 1992; RAU, 1999). Fungos do gênero *Schizophyllum* são encontrados em todas as partes do mundo onde crescem plantas lenhosas (COOKE, 1961).

Figura 1 – Cultura do fungo *S. commune* BRM 060008 em meio PDA



Fonte: A autora

O polissacarídeo SPG é convencionalmente produzido por fermentação de cultura submersa utilizando glucose como fonte de carbono, entretanto, o fungo *S. commune* pode utilizar substratos de biomassa agrícola na produção eficiente de SPG, resultando em redução do valor de produção do polissacarídeo (JAMSHIDIAN *et al.*, 2016; LEATHERS *et al.*, 2016; SUTIVISEDSESAK *et al.*, 2013).

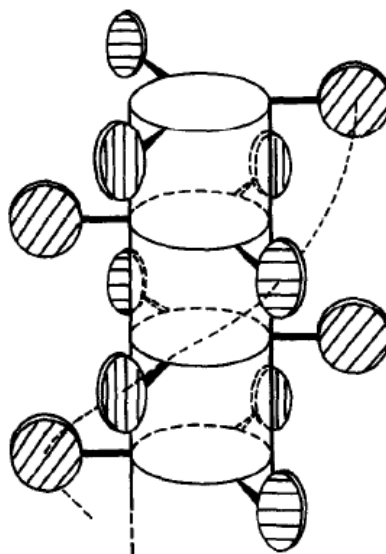
O SPG é um polissacarídeo neutro extracelular que desde a sua descoberta, no final dos anos 1960, tem atraído grande atenção da comunidade científica e da indústria. Esse polissacarídeo, também conhecido como sizofiran ou sonifilan, apresenta ampla aplicação na indústria farmacêutica (ZHANG *et al.*, 2013), com muitas bioatividades reportadas, entre as mais promissoras estão a antitumoral e a imunobiológica (BOHN; BEMILLER, 1995). O SPG é uma β -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana formada por unidades de 1,3- β -D-glucopiranosose na cadeia principal com substituição em O-6 por terminais não redutores de β -D-glucopiranosose a cada três moléculas de glucose da cadeia principal (RAU *et al.*, 1992) (Tabela 1), com massa molecular variando de 6 e 12 x 10⁶ g mol⁻¹ (RAU, 2004) e grau de ramificação de 0,33 (NOVAK; VETVICKA, 2008). Esse polissacarídeo adota uma conformação de tripla hélice em água a 25 °C (NORISUYE; YANAKI; FUJITA, 1980) que se funde em cadeias simples enroladas aleatoriamente a cerca de 135 °C, mas não é recuperável a conformação inicial por volta de 150 °C (YANAKI; TABATA; KOJIMA, 1985).

Em relação ao arranjo das cadeias poliméricas do SPG em sua estrutura tripla hélice, as cadeias laterais estão do lado de fora da hélice (Figura 2) impedindo assim a formação de grandes agregados insolúveis de tripla hélice por meio de ligações de hidrogênio (BOT *et al.*, 2001). Acredita-se que os grupos hidroxila nas cadeias laterais desempenham um papel crucial na interação com a água, levando assim a uma melhor solubilidade em água. Em geral, β -glucanas lineares são insolúveis em água, mas quando ramificadas são solúveis, o que é uma forte evidência de que a hidroxila da cadeia lateral se associa facilmente com a água (XU; XU; ZHANG, 2012).

Quanto a solubilidade, o SPG pode ser solúvel em água e/ou em dimetilsulfóxido (DMSO). Entretanto, a tripla hélice sofre uma "fusão" abrupta quando o conteúdo de DMSO adicionado à solução aquosa excede cerca de 85% em massa (NORISUYE; YANAKI; FUJITA, 1980). Outras condições que desestabilizam a estrutura tripla hélice incluem temperaturas acima de 135 °C em meio aquoso neutro (YANAKI; TABATA; KOJIMA, 1985) e em soluções básicas fortes (pH>13) (KITAMURA *et al.*, 1996). A tripla hélice do SPG em solução de NaOH (pH 13,5) foi dissociada para bobina aleatória

por Sakuragi *et al.* (2008) sendo que, quando o SPG recupera a conformação forma um domínio hidrofóbico. O SPG na forma de hélices simples (s-SPG) pode recuperar a sua conformação de tripla hélice original (t-SPG) trocando DMSO por água ou neutralizando a solução alcalina com ácido (ZHANG *et al.*, 2013).

Figura 2 – Tripla hélice do SPG (discos hachurados – moléculas de D-glucose da cadeia lateral; o cilindro central – núcleo da hélice. Os discos, juntamente com as moléculas de água intervenientes formam uma cadeia helicoidal indicada pela linha tracejada)



Fonte: Modificada de Itou e Teramoto (1987)

Quanto a aplicação, o SPG é um biopolímero já utilizado em cosméticos como o Murad's Sleep Reform Serum (HYDE; BAHKALI; MOSLEM, 2010). A companhia Macrocare Tech Co. Ltd., com sede na Coreia do Sul, fornece ingredientes cosméticos funcionais e aditivos alimentares, incluindo o SPG como ingrediente bioativo para cosméticos, apresentando efeito anti-inflamatório, hidratante e diminuição de outros danos devido à exposição a luz solar (MACROCARE, 2022, web).

A GfN & Selco, na Alemanha, fornece matérias-primas para cosméticos, produtos farmacêuticos e suplementos alimentares, também oferta o SPG com a descrição de um pó branco a ligeiramente amarelado, polissacarídeo solúvel em água, e o destaca como sendo um valioso agente natural para o tratamento de acne e manchas na pele. Destaca-se ainda suas propriedades imunomoduladoras, efeito na melhora da síntese de colágeno, efeito na proliferação de queratinócitos, necrófagos radicais e efeito antioxidante (GfN & SELCO, 2022, web).

A Contipro, empresa checa que tem como principal produto o ácido hialurônico, também fornece o SPG na forma de pó, fibras ou grânulos brancos a ligeiramente amarelados ou acinzentados. Apresentam o SPG como um polissacarídeo extracelular do fungo *S. commune* que é capaz de regular a resposta de diferentes tipos de células a estímulos externos que afetam sua viabilidade e síntese proteica. Destaca-se a capacidade que o polissacarídeo tem de influenciar positivamente os efeitos visíveis do envelhecimento da pele (CONTIPRO, 2022, web).

Outras aplicações como o uso do SPG na indústria petroquímica também vêm sendo investigada, uma vez que a estabilidade deste biopolímero sob alta temperatura e salinidade torna-o promissor na recuperação de óleo (GAO, 2016).

O SPG pode ser misturado com outros polímeros no desenvolvimento de materiais curativos para cicatrização de feridas. Safae-Ardakani *et al.* (2019) prepararam blendas de SPG/Poli(álcool vinílico) – PVA por eletrofiação variando as proporções de ambos os polímeros. O solvente escolhido para a preparação das soluções foi a água. A solução aquosa de SPG (1,5% m/v) foi misturada com a solução de PVA (10% m/v) em diferentes concentrações para preparação da solução final a ser submetida ao processo de eletrofiação. O glutaraldeído foi utilizado como agente reticulante. Em relação aos testes biológicos, observaram que a mistura SPG/PVA na proporção 20:80 (v/v) apresentou os melhores resultados. A citotoxicidade das nanofibras foi realizada pelo método MTT com fibroblastos do rato (L929) por 1 a 3 dias. Os resultados revelaram que as nanofibras obtidas não apresentaram citotoxicidade ao crescimento da célula L929 e teve uma boa biocompatibilidade *in vitro*. O filme SPG/PVA-20 exibiu maior viabilidade celular (~ 132%) em relação ao PVA puro (~ 82%) no dia 1. A viabilidade das células em relação a amostra SPG/PVA-20 foi ainda maior (~ 150%) no dia 3.

Hamedi *et al.* (2020) desenvolveram um compósito hidrogel de SPG e CB. Para promover uma melhor interação com o SPG, a celulose foi funcionalizada com um aminoalquilsilano (3-aminopropil triethoxisilano - APTES) e, posteriormente, foi imersa em uma solução aquosa de SPG (1% m/v) por 72 h. Em seguida, o glutaraldeído foi empregado como um agente de reticulação. O estudo de citotoxicidade foi conduzido pelos autores com intuito de investigar o efeito dos agentes de modificação (APTES) e reticulação (glutaraldeído). Para tal, a biocompatibilidade (*in vitro*) foi investigada na presença de células fibroblásticas dérmicas humanas e os resultados mostraram que a CB e CB amino-funcionalizada exibiram toxicidade insignificante. Para o compósito, a viabilidade celular aumentou significativamente, indicando que o SPG pode estimular a

proliferação celular. Os pesquisadores concluíram que a presença do agente de reticulação e do APTES não afetou a biocompatibilidade da nova membrana desenvolvida. Quanto a atividade antibacteriana, amostras foram avaliadas contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Os autores não observaram diferença significativa entre as curvas de crescimento de ambas as bactérias na ausência e presença da membrana de CB. Já na presença do compósito, o crescimento bacteriano foi inibido significativamente, mostrando efeito inibitório de 50% e 30% contra *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Segundo os autores, esses resultados considerados moderados podem ser melhorados pela adição de agentes antibacterianos.

Em outro estudo conduzido por Hamedi e Shojaosadati (2021), foram incorporadas nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) na mistura CB amino-funcionalizada/SPG para incrementar a atividade antibacteriana. A mistura CB amino-funcionalizada/SPG mostraram 40% e 20% de efeito inibitório contra *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Para o nanocompósito com ZnO o efeito inibitório foi de 90% e 70% contra *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Estes resultados revelaram que as nanopartículas diminuíram ainda mais o crescimento bacteriano das bactérias testadas. A citotoxicidade dessas amostras foi investigada em células de fibroblastos humanos normais pelo ensaio MTT. A viabilidade celular foi superior a 70%, sendo assim consideradas amostras biocompatíveis e não tóxicas para as células fibroblásticas (norma ISO 10993-5). A viabilidade celular aumentou para o compósito em relação a amostra controle; e um aumento foi observado com o tempo de exposição (24, 96, 240 e 360 h). Os autores atribuem o aumento da viabilidade celular à presença do biopolímero SPG que pode estimular a proliferação celular. Com a introdução de nanopartículas de ZnO, a viabilidade celular diminuiu ligeiramente e foi atribuída ao elevado teor de íons de zinco das nanopartículas, o que mostrou um efeito adverso na viabilidade celular.

3.3 Celulose bacteriana (CB) – Origem, estrutura, propriedades gerais e aplicações

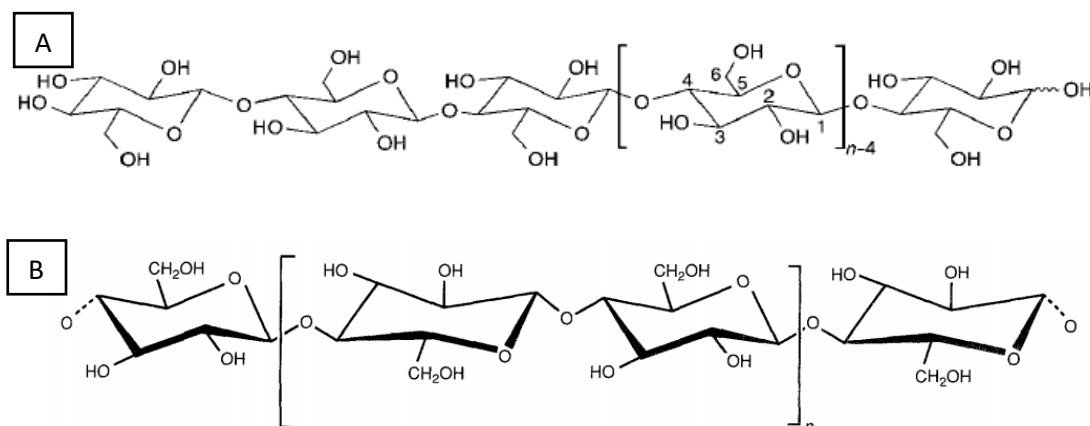
A celulose não é apenas sintetizada por plantas, alguns microrganismos são capazes de produzir este biopolímero, como as bactérias do gênero *Komagataeibacter*. Bactérias do gênero *Komagataeibacter* podem ser definidas como Gram-negativa, estritamente aeróbia, vivendo principalmente em frutas e vegetais em processo de decomposição. Essas bactérias são capazes de converter glucose, glicerol, sacarose, frutose, manitol e outras fontes, em fontes de carbono em temperaturas entre 25-30 °C e

na faixa de pH 3-7, com propriedades e rendimentos diferentes (CACICEDO *et al.*, 2016). A CB foi descoberta por A. J. Brown em 1886 que observou a formação de uma membrana gelatinosa na superfície do caldo de fermentação do vinagre. Por análise microscópica, a estrutura identificada foi quimicamente semelhante à celulose vegetal com a presença de bactérias distribuídas por toda a superfície da membrana (BROWN, 1986; CACICEDO *et al.*, 2016; KLEMM *et al.*, 2001). Diferentemente da celulose vegetal a CB possui suas fibras na ordem de nanômetros e mesmo apresentando a mesma estrutura química da celulose vegetal, são morfologicamente diferentes (ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014). Outra diferença interessante é que a CB apresenta elevada pureza, já a celulose sintetizada por plantas necessita de processos de purificação complexos, dispendiosos e altamente poluentes para a extração da lignina e hemicelulose, já o processo de obtenção e de purificação da CB é relativamente simples (BROWN JR; SAXENA; KUDLICKA, 1996).

A produção da CB tem sido tradicionalmente realizada usando o meio de cultura comumente denominado HS, homenageando Hestrin e Schramm que desenvolveram o meio em 1954 (CACICEDO *et al.*, 2016). O meio HS é composto de glucose, peptona, extrato de levedura, fosfato dissódico, ácido cítrico e pH 6 (HESTRIN; SCHRAMM, 1954). Pesquisadores buscam desenvolver várias estratégias a fim de aumentar a produção da CB incluindo o projeto de reatores avançados e a utilização de várias fontes de carbono alternativas, como, sucos de frutas, melão de cana, restos de alimentos e resíduos agrícolas e industriais (ISLAM *et al.*, 2017).

A celulose é um biopolímero de carboidrato formado a partir da repetição de moléculas de β -D-glucopirranose que estão covalentemente ligadas por funções acetais entre o grupo OH equatorial do átomo de carbono-4 (C4) e o átomo de carbono-1 (C1), conhecida por ser uma β -(1 $\rightarrow$ 4)-glucana. A celulose é um polímero extenso de cadeia linear com elevado número de grupos hidroxilas, sendo três por unidade de anidrogucose (AGU) (Figura 3A), presentes na conformação β -(1 $\rightarrow$ 4) (ligação entre o carbono 4 e o carbono 1) termodinamicamente preferida (KLEMM *et al.*, 2005). Para acomodar os ângulos de ligação pelos grupos acetais em ligações de oxigênio, todo segundo anel AGU é rodado em 180° no plano. Desta maneira, duas unidades estruturais adjacentes definem o dissacarídeo celobiose. Como resultado, a celobiose é a unidade estrutural de repetição das cadeias de glucana na celulose (Figura 3B) (BROWN JR; SAXENA; KUDLICKA, 1996; KLEMM *et al.*, 2005).

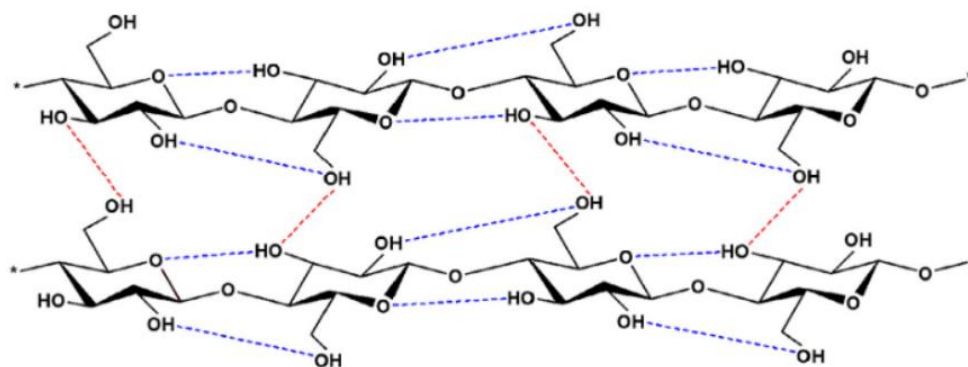
Figura 3 - Estrutura da celulose: A) Estrutura molecular da celulose e B) Unidade de repetição da celulose (celobiose) - entre parênteses



Fonte: (A) KLEMM *et al.* (2005); (B) BROWN JR; SAXENA; KUDLICKA (1996)

A estrutura molecular da celulose confere propriedades características como hidrofiliicidade, quiralidade, degradabilidade e ampla variabilidade química iniciada pela alta reatividade do doador dos grupos OH. É também a base para extensas redes de ligações de hidrogênio (Figura 4), que fornecem à celulose uma infinidade de estruturas e morfologias de fibras parcialmente cristalinas (KLEMM *et al.*, 2005).

Figura 4 – Ligações de hidrogênio na celulose: intramolecular (---) e intermolecular (---)

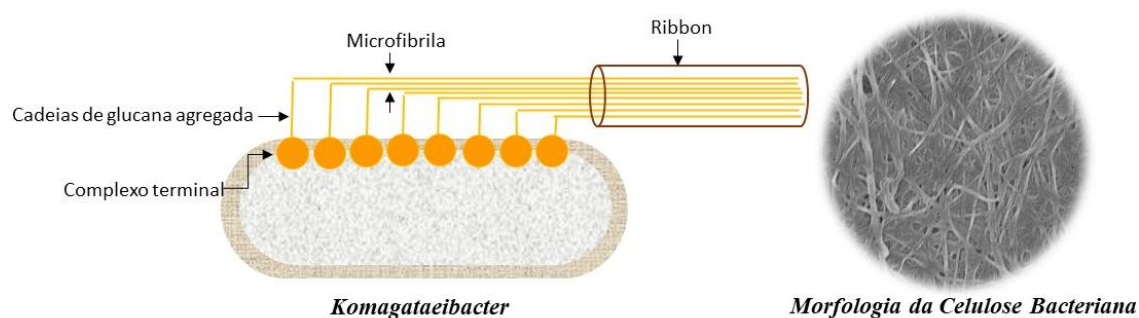


Fonte: PHANTHONG *et al.* (2018)

Como um EPS, a CB pode ser produzida em condição estática formando uma película de celulose na interface líquido/ar (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991) e em condição agitada pode se apresentar na forma de esferas (SCHRAMM; HESTRIN, 1954). Uma película de CB é formada por microfibrilas, compostas por cadeias de glucanas interligadas por ligações de hidrogênio de modo que um domínio cristalino é produzido

(ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991). Chawla *et al.* (2009) explicam o mecanismo de síntese da CB produzida por *Komagataeibacter xylinus* ocorrendo na forma de fibras de celulose. As bactérias produzem duas formas de celulose, a celulose I, o polímero em forma de fita; e a celulose II, o polímero amorfo termodinamicamente mais estável. A estrutura microfibrilar da CB é responsável pela maioria de suas propriedades como elevados valores de resistência à tração, grau de polimerização e índice de cristalinidade. A síntese compreende o transporte da fonte de carbono, como a glucose, de fora para dentro da célula, onde ocorre a transformação da glucose em uridina difosfoglucose (UDP-glucose) via glucose-6-fosfato e glucose-1-fosfato, a celulose sintase considerada a enzima essencial no processo de síntese produz a celulose a partir da UDP-glucose. A bactéria *K. xylinus* sintetiza a celulose entre a membrana externa e a citoplasmática. Os complexos terminais estão dispostos linearmente e em associação com poros na superfície da bactéria. Na primeira etapa da formação da celulose, os agregados de cadeia de glucanas consistem em, aproximadamente, 6-8 cadeias alongadas no complexo. Essas fibrilas subelementares na segunda etapa formam as microfibrilas que formam na terceira etapa o *ribbon* em que a matriz de *ribbons* entrelaçados constitui a membrana de CB (KLEMM *et al.*, 2001). Na Figura 5 é demonstrado as fibrilas por micrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e um esquema de formação de microfibrilas da CB produzidas *K. xylinus*.

Figura 5 - Esquema de montagem de microfibrilas de celulose por *K. xylinus* e micrografia de MEV mostrando uma estrutura de rede de nanofibras



Fonte: Elaborado e modificado de CHAWLA *et al.* (2009) e CACICEDO *et al.* (2016)

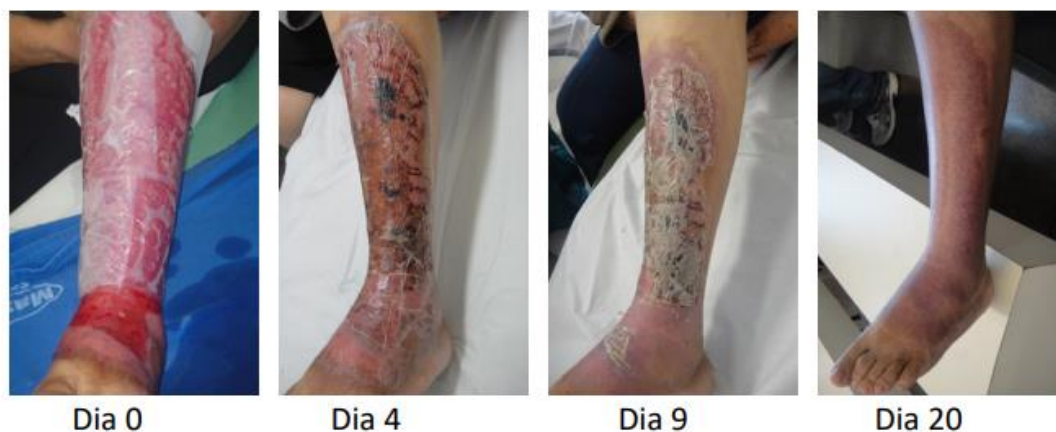
A CB tem despertado grande interesse devido as suas características estruturais únicas e impressionantes propriedades físico-mecânicas (SHAH *et al.*, 2013). Cacicedo *et al.* (2016) destacam a sua estrutura porosa composta por nanofibras dispostas aleatoriamente, a alta capacidade de adsorção de água e os grupos de hidroxila livres

como as vantagens mais importantes da CB. Klemm *et al.* (2018) destacaram a alta pureza, estrutura de rede de nanofibras e um alto teor de água de 99% na forma de corpos de hidrogel mecanicamente e termicamente estáveis, com grau de polimerização de 4.000 a 10.000 como propriedades únicas da CB.

Devido a estas propriedades, a CB vem sendo estudada para uma variedade de aplicações em diferentes campos, incluindo seu uso como um biomaterial para suporte em engenharia de tecidos (STUMPF *et al.*, 2018) e na cicatrização de feridas (KUMAR *et al.*, 2018). Curativos de CB com potencial cicatrizante podem ser encontrados pelo nome Bionext® e Xcell® (PICHETH *et al.*, 2017).

O produto Bionext® é uma membrana semitransparente projetada para regular a umidade da água, promover o metabolismo celular e proteger as feridas de microrganismos externos. Essa membrana adere completamente à lesão de forma prática e segura, formando uma camada salina que se desprende de forma independente quando o tecido é reconstruído. O curativo permanece intacto até 15 dias o que elimina as trocas frequentes de curativos e apresenta como vantagens o auxílio na redução da dor, manter a temperatura de cicatrização, hemostasia, diminuir a perda de eletrólitos e otimizar o processo de cicatrização (BIONEXT, 2022, web). Na Figura 6 é demonstrada a evolução em um período de 20 dias de tratamento de queimadura utilizando a membrana Bionext® em um estudo de caso com queimadura de segundo grau.

Figura 6 - Estudo de caso com a membrana Bionext® em queimadura de segundo grau



Fonte: BIONEXT, 2022, web

Um filme em gel de CB, é um sistema supramolecular contendo 99% de água em relação a sua massa total (KOIZUMI *et al.*, 2008), mas seu potencial de reidratação é

reduzido após sua primeira secagem como resultado do colapso da rede tridimensional da estrutura da CB após a desidratação. Desta forma, a absorção de água diminui drasticamente o que pode causar limitações quando se trata de algumas aplicações biomédicas (MEFTHAHI *et al.*, 2018; UL-ISLAM; KHAN; PARK, 2012). Entende-se que os métodos de secagem podem afetar as propriedades da CB e que a sua estrutura original pode ser destruída por secagem, mas também pode ser modificada de maneira controlada. A secagem por ar e prensagem (a temperatura ambiente ou aquecimento até aproximadamente 200 °C) resultam em perda da estrutura tridimensional e na porosidade. Entretanto, a liofilização é um procedimento suave e a CB não é sensível a danos por congelamento, sendo a estrutura original de nanofibras da CB preservada (KLEMM *et al.*, 2018).

A CB pode ser utilizada em várias aplicações de forma individual ou combinada com diferentes componentes (biopolímeros e nanopartículas) para proporcionar organização estrutural e matrizes flexíveis com distintas finalidades (PICHETH *et al.*, 2017). Shah *et al.* (2013) em sua revisão da literatura sobre abordagens para síntese de compósitos com CB descrevem que existem duas formas básicas de misturas, conhecidas como *in-situ* e *ex-situ*. A *in-situ* ocorre durante a produção da CB e a *ex-situ* que acontece depois da purificação da CB (CACICEDO *et al.*, 2016). Outra forma de obter compósitos de CB é a partir de soluções da CB dissolvida, porém o maior problema associado a este método é a limitada solubilidade da celulose (SHAH *et al.*, 2013) tanto em água quanto em muitos solventes orgânicos, em que esta insolubilidade em água está associada a forte ligação de hidrogênio intermolecular entre as moléculas de celulose (LINDMAN; KARLSTRÖM; STIGSSON, 2010).

3.3.1 Modificação *ex-situ* da CB

As modificações químicas da CB estão relacionadas às alterações nas estruturas e funcionalidades químicas, já as modificações físicas são realizadas para alterar porosidade, cristalinidade e densidade das fibras. Basicamente, existem duas estratégias para executar essas modificações citadas, chamadas de *in-situ* e *ex-situ* (Figura 7). Na modificação *in-situ*, a CB é modificada durante o cultivo das células bacterianas pela variação das condições de cultivo, adicionando novos materiais (aditivos, materiais de reforço e outros) e ou alterando a fonte de carbono fornecida que pode ou não causar mudanças químicas na CB. A modificação *ex-situ* da CB diferentemente da *in-situ* é

realizada após a formação deste polissacarídeo e é feita por métodos químicos e físicos (STUMPF *et al.*, 2018).

Figura 7 – Esquema representando métodos de modificação da CB: A) Modificação *in-situ* e B) Modificação *ex-situ*



Fonte: Adaptado de STUMPF *et al.* (2018)

Na literatura é possível encontrar muitos estudos que utilizam o método *ex-situ* com intuito de incorporar diferentes materiais na estrutura da CB na formação de blendas ou compósitos/nanocompósitos, sejam eles, outros polímeros (CACICEDO *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2011), nanopartículas (MANEERUNG; TOKURA; RUJIRAVANIT, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2020), extratos vegetais (UL-ISLAM *et al.*, 2021) ou antibióticos (LIYASKINA *et al.*, 2017).

Neste sentido, a CB vem sendo bastante utilizada na síntese de compósitos com vários outros polímeros, sendo que a natureza semelhante e a presença dos sítios de ligação de hidrogênio facilitam a síntese desses materiais. A literatura mostra uma diversidade de estudos sobre compósitos de CB com outros biopolímeros que levaram a melhorias em aplicações biomédicas (SHAH *et al.*, 2013).

Ul-Islam *et al.* (2011) utilizaram a bactéria *K. hansenii* PJK (KCTC 10505BP) na preparação de CB e, posteriormente, desenvolveram compósitos de CB e quitosana (Ch) pela imersão de membranas de CB em uma solução de Ch. O processo de penetração da

Ch foi avaliado considerando diferentes fatores, como a variação de temperatura (0, 25, 50 e 75 °C), o modo de operação (estático e agitado em 150 rpm) e o tempo de tratamento (5, 20 e 40 h). Os autores observaram que a penetração de Ch aumentou em função do aumento da temperatura até 50 °C, atribuída a diminuição da viscosidade da solução de Ch, o que facilitou a penetração na CB. Em 75 °C esse efeito também foi observado, mas sem nenhum aumento significativo. Quanto aos modos de operação estático e agitado, os resultados obtidos demonstraram que em condições de agitação a penetração de Ch foi melhorada, o que pode estar associada ao aumento no coeficiente de transferência de massa devido à agitação. O tempo de tratamento (h) com temperatura de 50 °C e modo de agitação de 150 rpm também foram estudados. Os autores constataram que a penetração da Ch aumentou com o tempo de tratamento de até 20 h e pequenos aumentos foram encontrados até 40 h.

Micrografias obtidas por MEV mostraram diferenças na morfologia para os compósitos em relação a CB, a solução de Ch penetrou dentro dos espaços vazios (poros) da CB, a superfície das membranas se tornou mais densa e compacta com o tempo de tratamento, ainda observaram o aumento da espessura das microfibrilas com o tempo de tratamento. Imagens de micrografia da seção transversal mostraram que a Ch penetrou profundamente na CB e a sua estrutura mudou para uma rede arranjada com poros especificamente orientados. A análise de FTIR para os compósitos revelou a presença de praticamente todas as bandas da CB e algumas bandas adicionais foram visualizadas para os compósitos em torno de 1550 cm^{-1} característicos de vibração de deformação NH_2 e em 1404 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-N de amida primária, justificando a presença da Ch. Análises de DRX mostraram que ocorreu diminuição da cristalinidade em relação a CB, de 71,1% para 65%, 64,5% e 64,3% segundo tratamento de 5, 20 e 40 h, respectivamente, sendo associado a penetração de moléculas de Ch nas microfibrilas da CB que interagem por ligação de hidrogênio, acarretando em perturbação da ligação de hidrogênio original entre as cadeias microcristalinas da CB. Sobre a capacidade de absorção de água, os resultados mostraram que a CB absorveu 85 vezes sua massa seca em água, já os compósitos apresentaram maior capacidade de absorção de água com a penetração de Ch na matriz, chegando a 106 vezes para amostras tratadas em 40 h devido à natureza hidrofílica da Ch. Os resultados mecânicos mostraram aumento das propriedades dos compósitos em relação a CB e mostraram que a resistência mecânica do compósito aumentou com o tempo de tratamento.

Hamed *et al.* (2020) recentemente desenvolveram um novo material compósito de CB e SPG. A fim de promover melhor interação com o SPG, a CB foi primeiramente funcionalizada com 3-(aminopropil)triétoxissilano (APTES), sendo posteriormente utilizado o glutaraldeído como agente de reticulação. Membranas de CB úmidas e liofilizadas (25 mm × 25 mm) foram escolhidas para a modificação com APTES. Os pesquisadores mantiveram as membranas de CB úmidas em solução de etanol antes da funcionalização para estimular a taxa de difusão de APTES na nanoestrutura de CB. O teor de nitrogênio (N) foi determinado a fim de verificar a quantidade de aminoalquilsilano nas amostras de CB (liofilizadas e úmidas) e constataram que a CB (sem secagem) modificada apresentou maior teor de N, sendo assim escolhida para preparação da mistura. Na preparação dos compósitos, os pesquisadores utilizaram uma solução aquosa de SPG 1% (m/v) e as membranas de CB modificadas liofilizadas foram embebidas por 72 h na solução. Após este procedimento, o glutaraldeído foi empregado.

Micrografias obtidas por MEV revelaram uma estrutura de rede tridimensional para a CB. Entretanto, algumas fibrilas foram fundidas após a modificação, porém, também foi observada uma estrutura 3D, mas com espessamento das fibrilas, resultado da cobertura com silano na superfície da membrana que pode estar associada a formação de pontes Si-O-Si na superfície da CB. Em relação as misturas com SPG, a morfologia da superfície mudou, sendo que o espaço entre as fibrilas da CB foi preenchido e a rede de fibrilas foi totalmente coberta com o SPG, tendo ocorrido segundo os autores a adesão entre as fibrilas em função da atração intermolecular entre a CB modificada e o SPG. Resultados também de espectroscopia por energia dispersiva (EDS) indicaram a presença de carbono e oxigênio para CB; e carbono, nitrogênio, oxigênio e silício para os filmes de CB amino-modificada/SPG. Resultados de FTIR mostraram bandas em 870 e 1600 cm⁻¹ (grupo NH₂) que confirmaram a presença do aminosilano na amostra modificada de CB. Esses resultados encontrados pelos autores determinam o sucesso da modificação pelo grupo aminoalquilsilano na superfície do filme de CB. Em relação aos resultados do DRX é importante destacar que a presença do pico agudo em 5,7° (2θ) característico do SPG aparece nas misturas de CB amino-modificada/SPG, indicando assim a bem-sucedida intercalação do SPG dentro da rede de CB. Em relação à estabilidade térmica (análise TGA), os compósitos apresentaram maior estabilidade que o SPG puro. No que diz respeito a capacidade de absorver água, a CB amino-modificada mostrou capacidade inferior em relação a CB pura, fato que está relacionado ao espessamento das fibrilas da CB que tornou a superfície da mesma mais compacta e

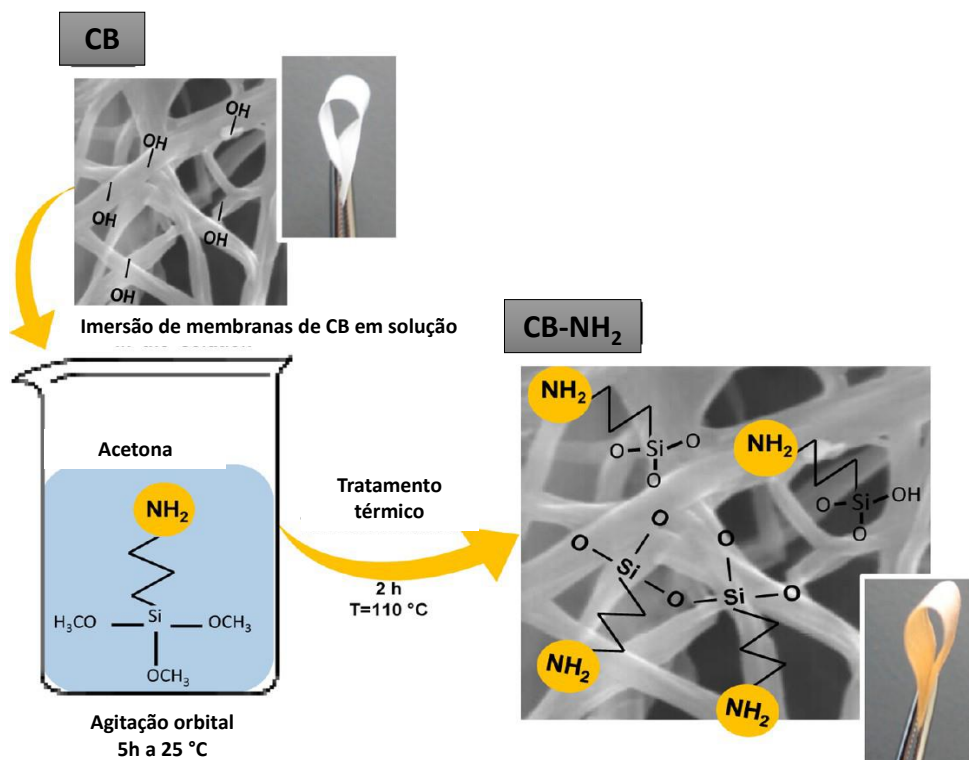
menos porosa com a modificação com aminosilano. Já a adição do SPG (altamente hidrofílico) intensificou a absorção de água nos compósitos. A propriedade mecânica de resistência à tração do compósito apresentou-se superior quando comparada a CB com a CB amino-modificada, o que segundo os autores torna esse novo compósito promissor na substituição de pele, em implantes cirúrgicos, como suporte para liberação de medicamentos e como uma membrana para cicatrização de feridas.

3.3.2 Modificação química superficial da CB com aminosilanos

Na literatura encontra-se alguns estudos sobre modificação química da CB com aminosilanos (FERNANDES *et al.*, 2013; FRONE *et al.*, 2020; HE *et al.*, 2020; SHAO *et al.*, 2017). Fernandes *et al.* (2013) produziram membranas de CB modificadas com 3-aminopropiltrimetoxisilano (APS) que apresentaram atividade contra *E. coli* e *S. aureus* com concentração bacteriana inicial de 12×10^5 e 50×10^4 UFC/mL e concentração final na presença de CB-NH₂ de 25×10^2 e 34×10^1 UFC/mL, respectivamente. As membranas de CB-NH₂ não foram tóxicas para as células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano, sendo úteis em aplicações biomédicas. Além disso, as membranas modificadas apresentaram propriedades mecânicas e térmicas aprimoradas.

A modificação química de grupos aminoalquil em superfícies de celulose normalmente se divide em três etapas. A primeira compreende a hidrólise do derivado de silano para formação de silanol; a segunda etapa corresponde a adsorção das espécies hidrolisadas nas nanofibrilas da CB por ligação de hidrogênio entre o silanol e o OH celulósico; e terceira tem relação com a reação de condensação química levando a pontes de siloxano (Si–O–Si) e ao enxerto na superfície das nanofibrilas de celulose através de ligações Si–O–C. As pontes de siloxano resultantes da autocondensação contribuem para a formação de uma rede de polissiloxano na superfície das nanofibras de CB (FERNANDES *et al.*, 2013). A Figura 8 apresenta o procedimento de grafitação química/modificação com aminosilano da CB usando APS.

Figura 8 - Procedimento geral para grafitização química da CB usando APS; Imagens das membranas de CB e sua flexibilidade antes e depois da modificação química



Fonte: Adaptado de FERNANDES *et al.* (2013)

Shao *et al.* (2017) obtiveram membranas de CB modificadas com (3-aminopropil) trietoxissilano - APTES pelo método de grafitização química. Membranas de CB foram imersas em soluções previamente preparadas de 2, 4, 6, 8 e 10 (% m) de APTES em etanol. Os pesquisadores observaram que o rendimento em relação a grafitização foi mais efetivo à medida que a quantidade de aminoalquilsilano foi maior. A análise de FTIR confirmou o sucesso na grafitização de grupos aminoalquilsilano na membrana de CB (A-g-CB), apresentando duas bandas em 1560 cm^{-1} e 780 cm^{-1} , atribuídas a flexão de grupos amino primários (NH_2) e vibração de estiramento de Si-O-Si, respectivamente. Além disso, as intensidades do pico em 2864 cm^{-1} , atribuída às vibrações de CH_2 da porção propil e silano, tornaram-se mais evidentes com o aumento no rendimento da grafitização. As vibrações típicas das ligações Si-O-C e Si-O-Si aparecem por volta de 1150 e 1135 cm^{-1} , dificilmente são vistas nas curvas, pois suas bandas são mascaradas pelas grandes e intensas faixas de vibração da CB (C-O-C). A presença de aminosilano na membrana de CB também foi confirmada pela análise XPS. Imagens de MEV mostraram que a CB₁₀ (10% de APTES) apresentou uma morfologia mais densa e espessa em relação a CB devido a cobertura com grupos aminoalquilsilano. A análise de EDS

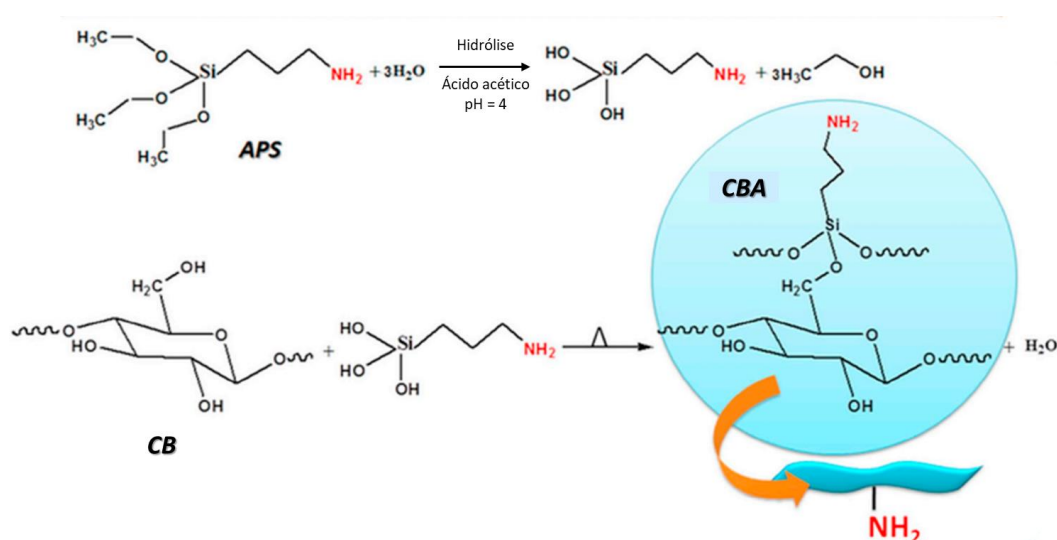
mostrou que os elementos Si e N foram distribuídos uniformemente na membrana da A-g-CB. Na análise de ângulo de contato, constatou-se que a hidrofobicidade da membrana de CB₁₀ foi consideravelmente aumentada pela modificação com APTES. Membranas A-g-CB obtiveram um melhor desempenho em relação a atividade antibacteriana comparada à CB, verificou-se que este resultado foi proporcional ao aumento do rendimento de grafitação da CB. As membranas A-g-CB apresentaram atividade antibacteriana contra *E. coli*, *S. aureus* e *Bacillus subtilis* e ainda apresentaram propriedade antifúngica contra *Candida albicans*.

Estudos de citotoxicidade foram realizados a fim de investigar o efeito da grafitação na membrana de CB na proliferação de linhagens celulares de rim embrionário humano (HEK293), pelo ensaio MTT por 24 h. A viabilidade celular relativa foi ligeiramente diminuída com o aumento do rendimento de grafitação da membrana de CB, entretanto, ainda em uma faixa tolerável. Os pesquisadores destacam que a possível razão para a viabilidade celular ligeiramente mais baixa se deve às diferenças morfológicas entre membranas de CB e A-g-CB, visualizado no MEV, em que a CB se apresenta em uma rede 3D porosa que é ideal para abrigar o crescimento celular. Já nas membranas A-g-BC, a introdução de grupos aminoalquilsilano nas nanofibrilas de CB reduzem a porosidade das membranas, o que leva a um menor suporte para crescimento celular. A morfologia das células de HEK293 também foi avaliada e não foram constatadas alterações na morfologia das células HEK293 tratadas com membranas A-g-CB quando comparadas com as células em branco. Estes resultados mostram que as membranas A-g-CB são candidatas promissoras em aplicações biomédicas.

Frone *et al.* (2020) propuseram uma nova estratégia para o desenvolvimento de esponjas de CB com porosidade elevada. Os pesquisadores usaram a glucose (GL), a vanilina (V) e o ácido cítrico (AC) como agentes de reticulação verdes (não tóxicos e de baixo custo) em substituição aos comumente utilizados que apresentam toxicidade. O aminosilano γ -aminopropiltrietoxissilano (APS) foi usado para substituir parcialmente os grupos OH de superfície da celulose pelos grupos amino (Figura 9) e os agentes de reticulação foram usados a fim de que fossem covalentemente ligados à celulose pela reação entre o NH₂ da celulose funcionalizada com os grupos aldeído ou carboxila dos agentes de reticulação verde usados. Os resultados dos ensaios de FTIR-ATR, EDX e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) confirmaram a grafitação de grupos amino na superfície da CB e as reações de reticulação envolvendo os agentes utilizados e os grupos amino da CB funcionalizada, destacando formação de reação de

base de Schiff entre vanilina e CB modificada. A viabilidade celular das células de fibroblastos murinos (L929) foi avaliada pelo ensaio MTT e demonstrou que as esponjas de CB funcionalizadas e reticuladas não são citotóxicas. O óxido nítrico (NO) e o TNF- α (um protótipo de citocinas pró-inflamatórias) foram medidos na linha celular de macrófagos RAW 264.7 para avaliar a ativação da função secretora de macrófagos induzidos pela modificação química da superfície da CB. Os autores observaram que as modificações propostas na CB não desencadeiam uma resposta inflamatória em macrófagos, com exceção da esponja de CB modificada com glucose, o que requer uma investigação mais aprofundada.

Figura 9 - Grafatização de porções de aminosilano na superfície da CB (CBA)

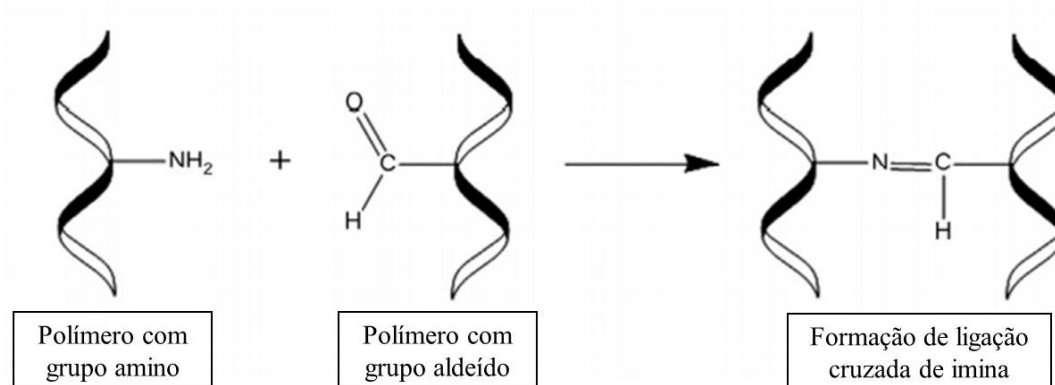


Fonte: Adaptado de FRONE *et al.* (2020)

3.3.3 Método de reticulação química com aldeído - Reação de base de Schiff

Os hidrogéis de polímeros naturais podem ser preparados pela reação de base de Schiff, no qual envolve a interação entre dois polímeros contendo grupos amina e aldeído, levando à formação de ligações imina (Figura 10). Polímeros naturais que não apresentam grupos aldeído ou amina são geralmente modificados para incorporar esses grupos na cadeia do polímero (GHORPADE, 2020). Os hidrogéis podem absorver elevada quantidade de água e fluidos biológicos (YANG *et al.*, 2022), como no caso da CB que apresenta alta pureza, alta resistência mecânica e sistema microporoso interconectado (KLEMM *et al.*, 2021).

Figura 10 – Representação da reação de base de Schiff entre polímeros contendo amino e grupos aldeído



Fonte: Adaptado de GHORPADE (2020)

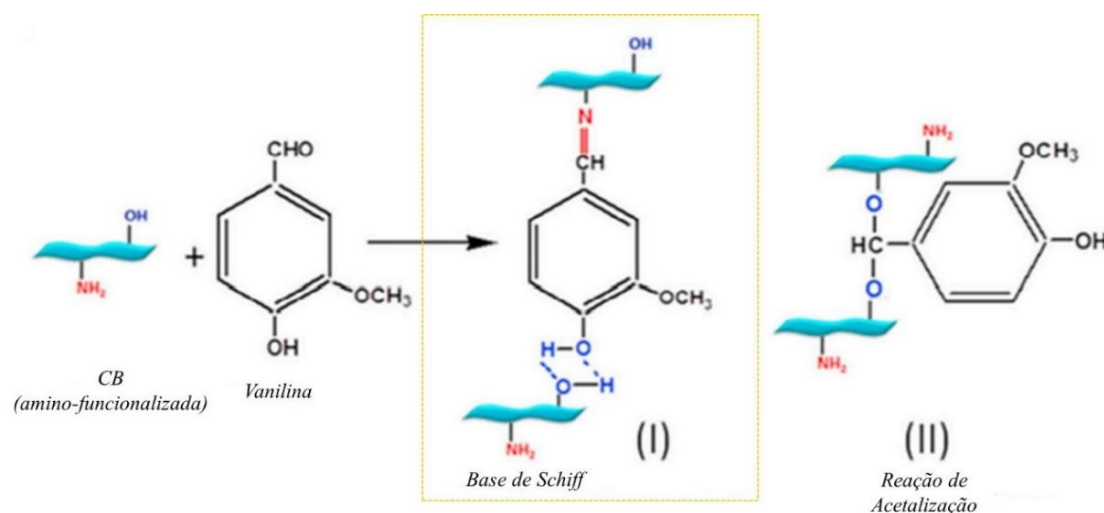
No caso de aplicações biomédicas, em função de muitos biomateriais não apresentarem propriedades mecânicas e estabilidade requeridas em ambientes aquosos, a reticulação pode ser feita com intuito de suprir suas desvantagens, porém a maioria dos agentes de reticulação causam alterações indesejáveis na funcionalidade dos biopolímeros ou resultam em citotoxicidade. O glutaraldeído é um agente de reticulação que resulta na melhora das propriedades mecânicas da CB, porém evidências contraditórias são fornecidas na literatura sobre a citotoxicidade de materiais reticulados com glutaraldeído (REDDY; REDDY; JIANG, 2015).

Outros caminhos vêm sendo explorados, como o uso de ácidos carboxílicos (ácido cítrico) (CIECHOLEWSKA-JUŚKO *et al.*, 2021; FRONE *et al.*, 2020; MEFTAH *et al.*, 2018). Aldeídos considerados “verdes” também vêm sendo utilizados como agentes de reticulação, exemplo, 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 para aplicações biomédicas, como atividade antibacteriana e antioxidante (COX *et al.*, 2021; TOMADONI *et al.*, 2019).

Frone *et al.* (2020) utilizaram a vanilina como agente de reticulação na produção de esponjas de CB e não relataram efeito citotóxico. Os autores propuseram em seu estudo o desenvolvimento de *scaffolds* 3D de CB a fim de imitar a estrutura da matriz extracelular (MEC). Diante disto, os pesquisadores abordaram uma nova estratégia na tentativa de obter estruturas 3D altamente porosas, com propriedades superiores, usando CB funcionalizada com aminosilano e reticulação com agentes não tóxicos, como a

glucose (GL), vanilina (V) e ácido cítrico (AC). Os agentes de reticulação foram ligados covalentemente à celulose pela reação entre o NH_2 da celulose funcionalizada (Figura 11). Alguns fatores benéficos na engenharia de tecidos, como a elevada porosidade, podem comprometer a integridade estrutural dos *scaffolds* e suas propriedades mecânicas. Desta forma, a modificação química da celulose por reticulação pode ser utilizada para melhorar as propriedades mecânicas e a estabilidade no ambiente corporal. Os resultados mostraram que existe um comprometimento na porosidade em termos percentuais em relação a CB (92,1%) de 86,1% para a CBA (CB amino-funcionalizada); 83,5% para a CBA-50V; 79,1% para a CBA-50AC e 84,2% para CBA-GL. Embora a reticulação tenha levado a uma ligeira diminuição do tamanho médio dos poros e da porosidade, os autores verificaram o aumento de resistência mecânica e um melhor controle da estrutura porosa, concluindo que a reticulação da CB com agentes “verdes” é uma forma promissora de obter simultaneamente boa porosidade e resistência mecânica, o que é importante para a engenharia de tecidos.

Figura 11 – Reações de reticulação possíveis no caso do agente de reticulação vanilina com a celulose; destaque para a reação de base de Schiff

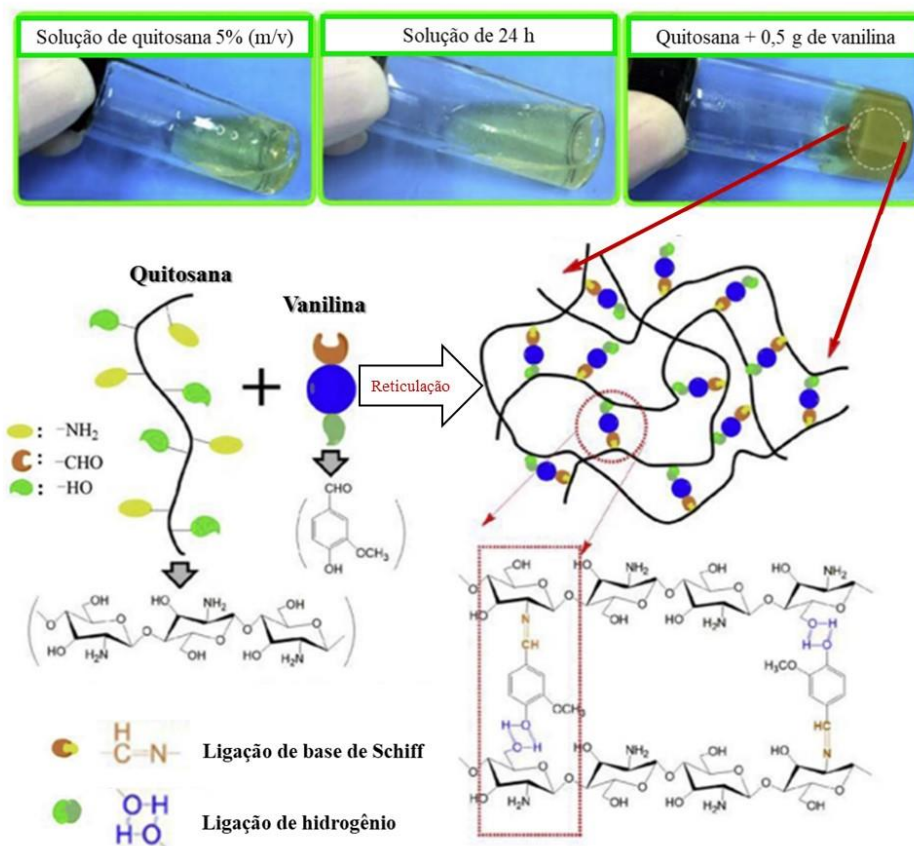


Fonte: Adaptado de FRONE *et al.* (2020)

Xu *et al.* (2018) utilizaram a vanilina natural, o principal componente do extrato da fava de baunilha, como agente de reticulação para desenvolver um hidrogel de quitosana de autocura. O grupo aldeído da vanilina reage com o grupo amino de uma molécula de quitosana pela reação de base de Schiff, enquanto seu grupo hidroxila forma ligações de hidrogênio com o grupo hidroxila ou amino em outra molécula de quitosana,

que fornece a base para a construção de uma rede reversível. Os autores descobriram que o efeito de autocura do hidrogel quitosana/vanilina originou-se principalmente da reconstrução da ligação base de Schiff, enquanto as ligações de hidrogênio eram relativamente estáveis a temperatura ambiente. Neste estudo, diferentes soluções do agente de reticulação vanilina foram preparadas (de 0,05 até 1,0 g de vanilina em 2 mL de álcool anidro). Em seguida, vários hidrogéis com diferentes proporções em massa de quitosana:vanilina foram preparados. Os autores constataram que 10 mL de solução de quitosana a 5% (m/v) com 0,3 g de vanilina alcançou um bom equilíbrio entre a capacidade de autocura e a resistência mecânica, tendo um tempo de gelificação moderado de 6 min. Quando a dosagem de vanilina excedeu 0,3 g, formou-se uma rede compacta em que as cadeias da quitosana não puderam mover-se livremente, pois as ligações foram fixadas pelas ligações massivas de hidrogênio, o que reduziu a formação de novas ligações híbridas por meio da troca dinâmica de ligações da base de Schiff. Isso fez com que o hidrogel de quitosana/vanilina perdesse sua capacidade de autocura. A ilustração esquemática das possíveis ligações está apresentada na Figura 12.

Figura 12 – Esquema mostrando as possíveis ligações no caso do agente de reticulação vanilina com a quitosana e formação de hidrogel



Fonte: Modificado de XU *et al.* (2018)

Tomadoni *et al.* (2019) utilizaram a vanilina como um agente de reticulação natural na formação de filmes de quitosana como uma maneira de melhorar as propriedades mecânicas e barreira de água dos filmes de quitosana. A análise de FTIR mostrou a vibração da banda imina que apareceu em $1637,3\text{ cm}^{-1}$ no filme compósito, que apoiam que pode ocorrer interações da vanilina com grupos amino da quitosana. Análises matemáticas e estatísticas usando a metodologia da superfície de resposta (MSR) assinalaram que a propriedade de barreira a permeabilidade ao vapor de água tende a diminuir com o aumento da concentração de vanilina e que a adição de vanilina propicia um incremento no módulo de Young nos filmes de quitosana. Além disso, a incorporação de vanilina melhora significativamente a capacidade antioxidante dos filmes de quitosana.

3.4 Polissacarídeos em curativos

Na atualidade existem uma diversidade de curativos que podem proteger a ferida de agravamentos nas lesões e que podem propiciar o isolamento da região do ambiente externo. Entretanto, considerando possíveis infecções e lentidão dos processos normais de cicatrização, torna-se urgente o desenvolvimento de curativos ideais que apresentem boa compatibilidade e forte atividade antibacteriana para promover a cicatrização de feridas (ZHENG *et al.*, 2020). Os polissacarídeos cada vez mais apresentam-se como alternativa no desenvolvimento de materiais modernos para curativos de feridas por serem de origem natural, altamente abundantes, de baixo custo, absorventes, não tóxicos, não imunogênicos, biocompatíveis e alguns deles também antimicrobianos. Os polissacarídeos são estruturalmente diversos o que pode fornecer uma ampla gama de parâmetros estruturais e propriedades para a fabricação de curativos específicos para a etiologia da ferida (ADUBA Jr; YANG, 2017).

No desenvolvimento de curativos, a CB é um agente promissor, pois a facilidade de inspeção (devido a transparência da CB), de propiciar um ambiente úmido adequado para a cicatrização, do efeito de alívio da dor, redução da infecção com capacidade de retenção de exsudato, tempo de cicatrização reduzido, aderência à ferida e fácil remoção após melhor epitelização, barreira física densa contra contaminação microbiana e lesões adicionais, troca gasosa, biocompatibilidade e propriedades mecânicas satisfatórias são algumas características atrativas da CB em aplicações como curativos (AHMED; GULTEKINOGLU; EDIRISINGHE, 2020; GORGIEVA, 2020; ZHENG *et al.*, 2020).

Alguns produtos comerciais usados no tratamento de feridas a base de CB são: Biofill®, Bionext®, XCell®, Dermafill® e Membracel® (ADITYA *et al.*, 2022; PICHETH *et al.*, 2017).

Embora a CB forneça barreira física que pode reduzir a penetração de bactérias na pele, em sua forma nativa a CB não oferece atividade antimicrobiana. Porém, compostos específicos podem ser adicionados na matriz de CB para fornecer propriedades antimicrobianas e/ou anti-inflamatórias (GORGIEVA, 2020; PORTELA *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2020). Neste sentido, Cacicedo *et al.* (2020) desenvolveram blendas de CB modificadas com quitosana para liberação controlada de ciprofloxacina (Cip) pelo método *ex-situ* com intuito de obter filmes com alta atividade antimicrobiana para curativos. A atividade antibacteriana dos filmes foi testada contra *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* e a incorporação do Cip mostrou forte inibição para ambas as bactérias. Porém, os autores observaram uma citotoxicidade moderada em células de fibroblastos humanos (GM07492), com valores comparáveis a um curativo comercial.

Em relação as β -glucanas, esses polissacarídeos podem apresentar efeitos anti-inflamatórios significativos no processo de cicatrização da ferida, melhorando a proliferação de células e a angiogênese (LIU *et al.*, 2017). Como exemplo disso, Kim *et al.* (2012) desenvolveram membranas de β -glucana (BG) e poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) por eletrofiação, e investigaram o comportamento de fibroblastos diante dessas membranas com posterior ensaio *in vivo*. A taxa de crescimento de fibroblastos dérmicos humanos foi mais elevada na presença das membranas com BG e aumentou com concentrações de BG mais elevadas nas membranas. As membranas contendo BG melhoraram a interação com as células vizinhas ao local do ferimento e aceleraram a cicatrização da ferida melhorando a interação, a proliferação de células e a angiogênese. Os autores concluíram que as membranas BG/PLGA podem ser úteis como um substituto da pele para melhorar a cicatrização de feridas.

Em outro estudo de Muthuramalingam *et al.* (2019) a capacidade de acelerar a cicatrização de feridas de um hidrogel da mistura de β -glucana (origem de *Schizophyllum* spp.) e poli(álcool vinílico) (PVA) foi avaliada. O hidrogel com a β -glucana acelerou significativamente a cicatrização da ferida como visto em seus resultados *in vivo* usando um modelo de ferida em camundongo. Os autores do estudo constataram que os hidrogéis à base de β -glucana são promissores como curativos úmidos na indústria de saúde.

Grip *et al.* (2018) desenvolveram um curativo de nanofibras por um método de eletrofiação de β -glucana, hidroxipropilmetilcelulose e óxido de polietileno com intuito

de melhorar a cicatrização de feridas em camundongos diabéticos. A β -glucana utilizada foi uma β -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-glucana isolada das paredes celulares da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Todos os grupos incorporados com a nanofibra de β -glucana exibiram melhora significativa na cicatrização da ferida em comparação com o filme sem a β -glucana, indicando o potencial das nanofibras com β -glucana para aplicação em curativo. Além disso, as nanofibras não afetaram a viabilidade celular durante a fase de proliferação da cicatrização de feridas.

CAPÍTULO 2

**Produção do polissacarídeo fúngico de
*Schizophyllum commune***

4 CAPÍTULO 2 - PRODUÇÃO DO POLISSACARÍDEO FÚNGICO DE *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE*

4.1 Materiais e métodos

4.1.2 Manutenção do microrganismo e produção do EPS de *S. commune*

O fungo *S. commune* BRM 060008 foi fornecido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, coletado em Brasília (DF) no Bioma Cerrado. A cepa do fungo de *S. commune* foi mantida sob refrigeração a 4 °C em placas de Petri em meio ágar batata dextrose (PDA), conforme demonstrado na Figura 13.

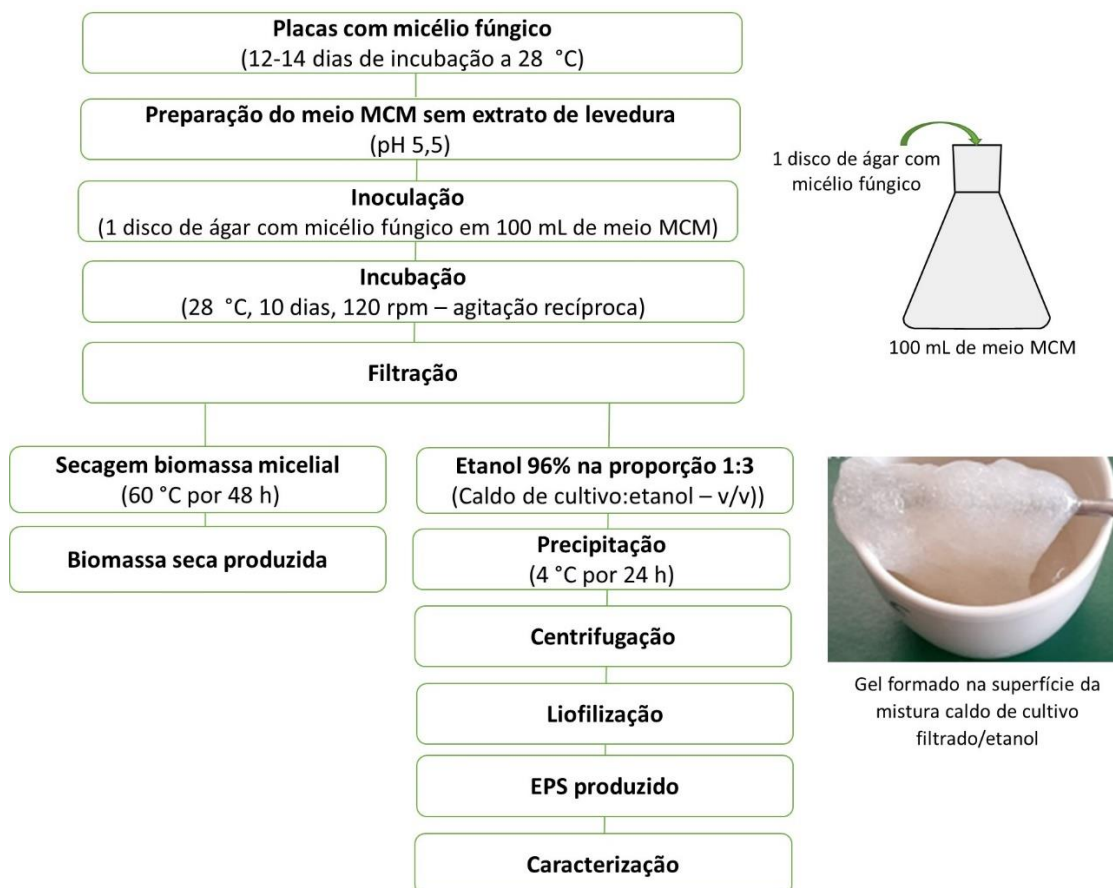
Figura 13 – Micélio fúngico de *S. commune* BRM 060008 em meio PDA (14 dias)



A cepa BRM 060008 foi testada quanto à sua capacidade de produção do polissacarídeo fúngico. O meio selecionado foi o MCM, sem o extrato de levedura (0,2% de peptona, 2% de glucose, 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05% de KH_2PO_4 e 0,1% de K_2HPO_4) (KIM *et al.*, 1999). O pH foi ajustado para 5,5 ($\pm 0,2$) com HCl e o meio líquido foi autoclavado a 121 °C por 15 min a 1 atm. Como inóculo, 1 disco de ágar (12 mm) completamente preenchido pelo micélio fúngico foi adicionado a 100 mL de meio MCM em frasco de Erlenmeyer de 500 mL e incubado a 28 ± 2 °C, 120 rpm (movimento recíproco) por 10 dias. A fim de garantir a separação do caldo de cultivo dos resíduos do meio, o processo de filtração a vácuo em papel filtro Whatman nº 1 foi realizado. No caldo obtido foi adicionado etanol 96% na proporção de 1:3 (caldo: etanol, (v/v)) e mantido a 4 °C por, pelo menos, 24 h ou até precipitar o polissacarídeo. Entretanto, um gel (EPS) (Figura 14) formou-se na superfície da mistura caldo/etanol e foi coletado, não havendo formação de precipitado. Os experimentos foram realizados em triplicata. Na

Figura 14 está o fluxograma da primeira etapa do procedimento experimental de produção de EPS.

Figura 14 – Procedimento de produção do EPS de *S. commune*



4.1.3 Estimativa da produção de biomassa e consumo de glucose

A biomassa separada dos cultivos foi lavada com água destilada (30% em relação ao caldo) e seca em estufa com circulação de ar a 60 °C por 48 h. O consumo de glucose do caldo de cultivo ao final de 10 dias de crescimento do fungo foi obtido pelo método colorimétrico com kit de glicemia enzimática (Wiener lab.), utilizando curva de calibração com padrão de glucose 1 g L⁻¹. A determinação espectrofotométrica foi realizada a 505 nm em espectrofotômetro UV-visível (Biospectro SP- 2000).

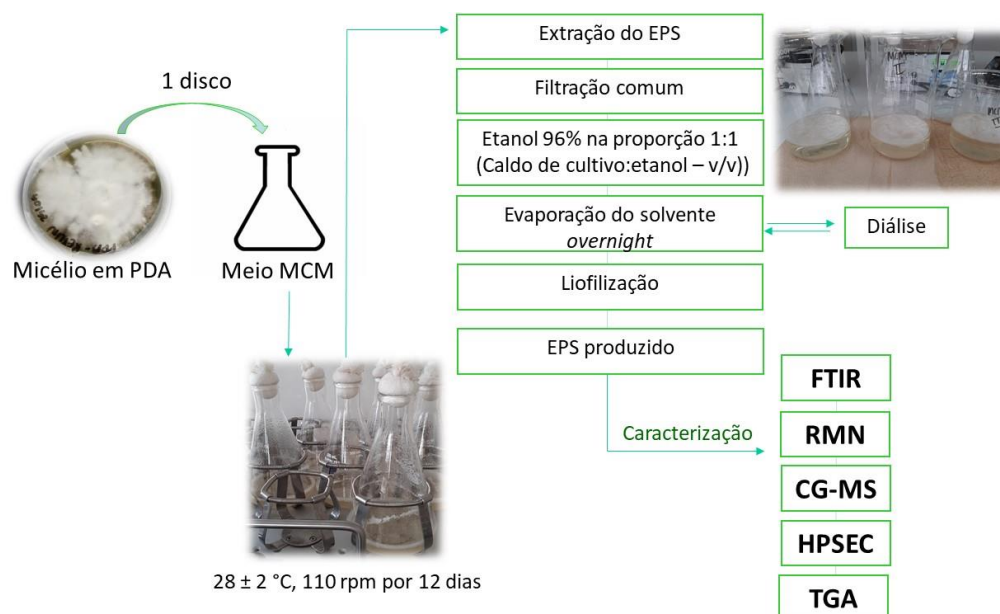
4.1.4 Produção de EPS de *S. commune* da amostra dialisada

Este mesmo procedimento descrito acima foi novamente realizado com alguns ajustes de condições de cultivo [1 disco do micélio (12 mm) com o ágar em meio PDA,

100 mL de meio MCM em frasco de Erlenmeyer de 500 mL e incubação a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 110 rpm por 12 dias]. O caldo de cultivo e o micélio fúngico foram separados por método de filtração simples, empregando uma peneira de malha fina. No filtrado obtido foi gradualmente adicionado etanol 96% na proporção de 1:1 (caldo: etanol, (v/v)) até separação do polissacarídeo na forma de um gel. O EPS foi dialisado em membranas de 6-8 KDa por 24 h em água, antecedendo o processo de liofilização. A Figura 15 mostra o procedimento de produção do EPS dialisado de *S. commune*.

As amostras caracterizadas neste estudo foram nomeadas da seguinte forma: SPG como o polissacarídeo comercial e SPG-s-D e SPG-D como o polissacarídeo produzido da linhagem *S. commune* BRM 060008 sem e com diálise, respectivamente.

Figura 15 - Procedimento de produção do EPS dialisado de *S. commune*



4.1.5 Caracterização do EPS de *S. commune*

4.1.5.1 Análise de determinação de estrutura dos polissacarídeos

A caracterização dos grupamentos funcionais do polissacarídeo fúngico liofilizado foi feita por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), em um equipamento da Perkin Elmer Spectrum One no Laboratório de Caracterização de Materiais da Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE, no intervalo de 4.000 a 400 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e acessório de refletância total atenuada (ATR).

A análise de RMN foi realizada no Centro de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Paraná – UFPR. Os espectros de RMN das amostras foram analisados de acordo com um método anterior descrito, com algumas modificações (Sasaki *et al.*, 2013). As amostras (10 mg) foram dissolvidas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO) a 70 °C e os espectros de RMN de carbono e hidrogênio foram obtidos usando um espectrômetro Bruker Avance III 14.1 T equipado com uma cabeça de sonda inversa de 5 mm TCI-N2. Os deslocamentos químicos ^1H e ^{13}C foram determinados por experimentos 2D COSY (homonuclear), HMBC e HSQC (heteronuclear). Os últimos foram realizados por correlação via transferência inepta dupla com desacoplamento durante a aquisição usando pulsos de melhoria de sensibilidade na transferência inepta e pulsos modelados para todos os pulsos de 180 graus no canal ^{13}C , que foram compilados no programa de pulso `hsqcedetgpsisp2.2`. Os espectros 2D HSQC foram registrados usando detecção de quadratura na dimensão indireta e 8 varreduras por série de 1024 x 256 pontos de dados.

4.1.5.2 Metilação

A análise de cromatografia gasosa com detector de massa (CG-MS) foi realizada no Centro de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Paraná – UFPR. Os polissacarídeos solúveis em DMSO foram metilados usando NaOH-Me₂SO-MeI (Ciucanu; Kerek, 1984); 1,0 mg de polissacarídeo foi solubilizado em Me₂SO (250 µL), seguido pela adição de NaOH recém-pulverizado (10 mg) e agitação no vórtex por 10 min. MeI (500 µL) foi adicionado à mistura, agitado vigorosamente por 30 min, neutralizado com HOAc, e a amostra foi extraída com CHCl₃ e evaporada até a secura com uma corrente de N₂, este ciclo de metilação foi repetido para completar a reação. O polissacarídeo Per-O-metilado foi metanolizado com MeOH-HCl anidro 0,5 M (1,0 mL por 20 h a 80 °C) e cuidadosamente deixado para evaporar em uma capela de exaustão. Os Per-O-metilados-glucosídeos foram acetilados com Ac₂O-piridina (1:1, v/v; 200 µL) por 24 h a 25 °C. O excesso de gelo-água foi adicionado à solução e os derivados de acetato Per-O-metilado-glucosídeo (PMGAs) resultantes foram extraídos com CHCl₃ e cuidadosamente deixados para evaporar em uma capela de exaustão. As amostras foram analisadas por GC-MS usando um cromatógrafo Shimadzu QP-2020NX equipado com auto-injetor AOC 20i e eluídas em coluna capilar DB1ms da seguinte forma: injetor 250 °C, forno inicia a 100 °C (mantido 3 min) a 220 °C (10 °C min⁻¹, então mantido por

3 min), 250 °C (10 °C min⁻¹, então mantido por 3 min) e até 280 °C (10 °C min⁻¹, então mantido por 3 min). Os espectros de impacto de elétrons de (PMGAs) foram comparados com aqueles EI-MS deduzidos por Kochetkov e Chizhov (1966).

4.1.5.3 Análise de Massa Molar do SPG-D

HPSEC acoplado a um índice de refração (RI) (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) e um espalhamento de luz multilaser Dawn-F (MALLS) (Wyatt technology, EUA) foi usado para determinar a massa molar ponderal média (M_w) e polidispersão (M_w/M_n) de SPG-D. A amostra foi solubilizada a 1 mg mL⁻¹ em NaNO₂ 0,1 M e NaN₃ 0,02% e depois filtrada através de uma membrana de acetato de celulose de 0,22 µm antes da injeção. As análises cromatográficas foram realizadas a 25 °C usando quatro colunas Ultrahydrogel (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) conectadas em série (2000; 500; 250 e 120) e a solução eluente foi 0,1 M NaNO₂ e 0,02% NaN₃ em um fluxo de 0,6 mL min⁻¹. Foi utilizado um incremento do índice de refração da solução de soluto do solvente em relação a uma mudança na concentração do soluto (dn/dc) de 0,159 mL g⁻¹ (CARBONERO *et al.*, 2012). Os dados foram analisados usando o software Wyatt Technology ASTRA (Wyatt Technology, Santa Bárbara, CA, EUA).

4.1.5.4 Análise de estabilidade térmica

A análise termogravimétrica (TGA) do polissacarídeo fúngico liofilizado foi realizada no Laboratório de Materiais da Universidade da Região de Joinville - 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 (N₂) em um porta amostra de platina.

4.2 Resultados e Discussão

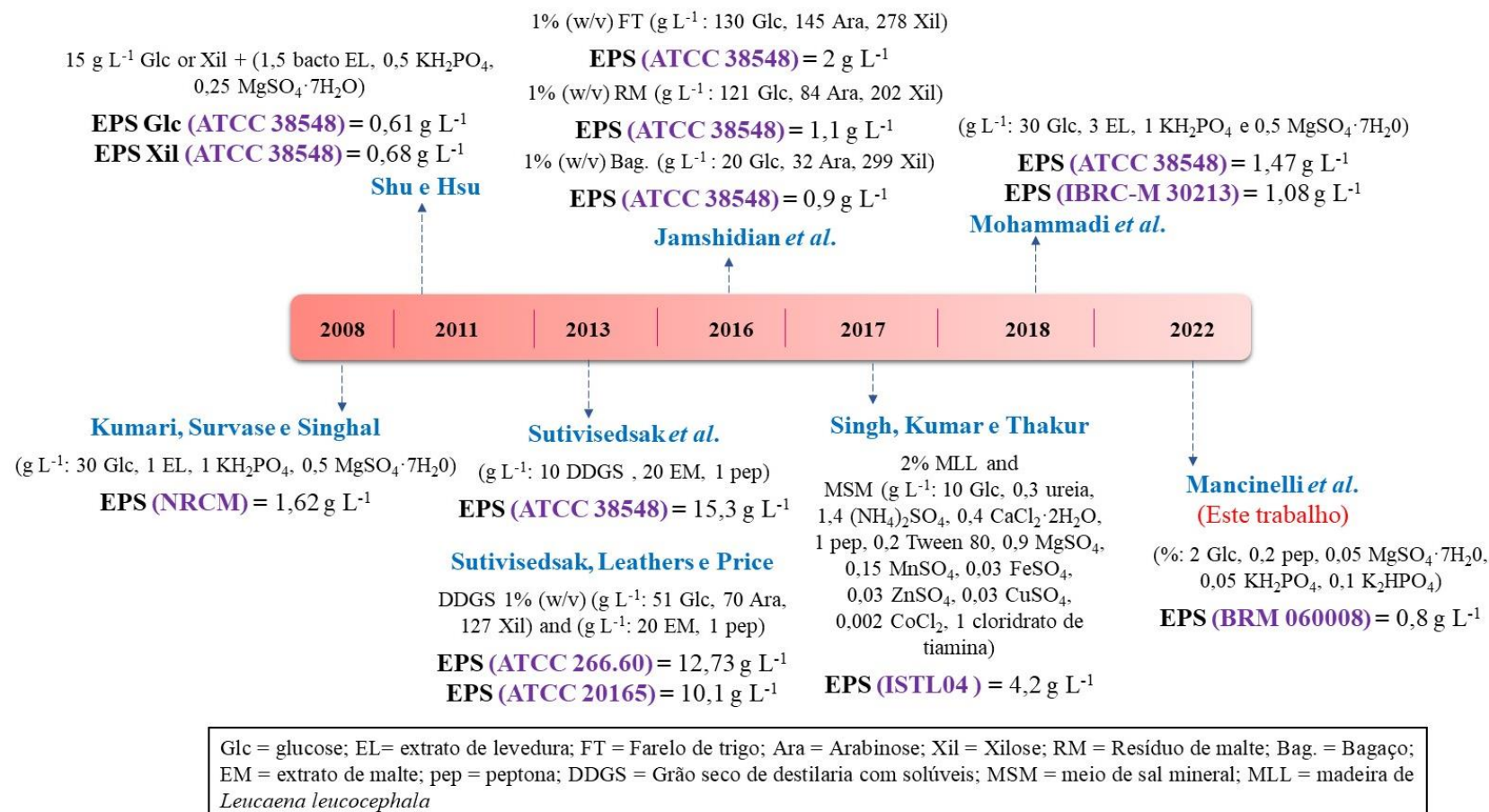
4.2.1 Rendimento do EPS de *S. commune*

A cepa BRM 060008 apresentou um rendimento de EPS de $0,8 \pm 0,15$ g L⁻¹, concentração de biomassa de $3,2 \pm 0,21$ g L⁻¹ e glucose residual de $1,8 \pm 0,02$ g L⁻¹ em 10 dias de cultivo. Resultado de rendimento semelhante para EPS foi encontrado por

Dalonso (2018), apresentando valor de $0,75 \pm 0,22 \text{ g L}^{-1}$ com a cepa de *S. commune* H4-8 em meio de cultivo MCM durante 9 dias de fermentação. Nas condições de cultivo testadas, o conteúdo de EPS dialisado (SPG-D) apresentou um rendimento de $0,64 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$, acarretando em alguma perda em termos de rendimento decorrente do processo.

De forma geral, sabe-se que a quantidade de SPG produzida é influenciada diretamente pela linhagem do fungo, meio de cultivo e condições de cultivo (Figura 16).

Figura 16 – Produção de EPS a partir de diferentes linhagens de *S. commune*; destaque para diferentes linhagens em roxo



Sutivisedsak, Leathers e Price (2013) em seu estudo com as cepas de *S. commune* ATCC 20165 e CBS 266.60, obtiveram rendimento de $10,1 \pm 0,7$ e $12,7 \pm 0,1$ g L⁻¹, respectivamente, em 8 dias de cultivo a 30 °C. Os autores testaram 11 cepas do mesmo fungo, no qual apenas uma produziu quantidades inferiores que a encontrada no presente estudo, alcançando $0,6 \pm 0,1$ g L⁻¹ para a linhagem ATCC 44200. O meio líquido utilizado continha 1% de grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS), 2% (m/v) de extrato de malte e 0,1% (m/v) de peptona.

Shu e Hsu (2011) obtiveram rendimentos inferiores com outra linhagem de *S. commune* (ATCC 38548) em meio completo com glucose, obtendo $0,61 \pm 0,07$ g L⁻¹. De maneira separada em cada experimento, os autores compararam glucose, xilose e cascas de arroz hidrolisadas. O maior rendimento foi alcançado com meio completo e xilose como fonte de carbono, obtendo $0,68 \pm 0,04$ g L⁻¹, já a menor obtenção foi observada com cascas de arroz hidrolisadas, de $0,11 \pm 0,02$ g L⁻¹. O hidrolisado foi completamente neutralizado com Ca(OH)₂ e tratado com carvão ativo, sendo adicionados em g L⁻¹: 3,0 de extrato de levedura, 0,5 de KH₂PO₄, e 0,25 de MgSO₄·7H₂O. Desta forma, a produtividade passou para $1,30 \pm 0,02$ g L⁻¹ de SPG em 16 dias, a 28 °C.

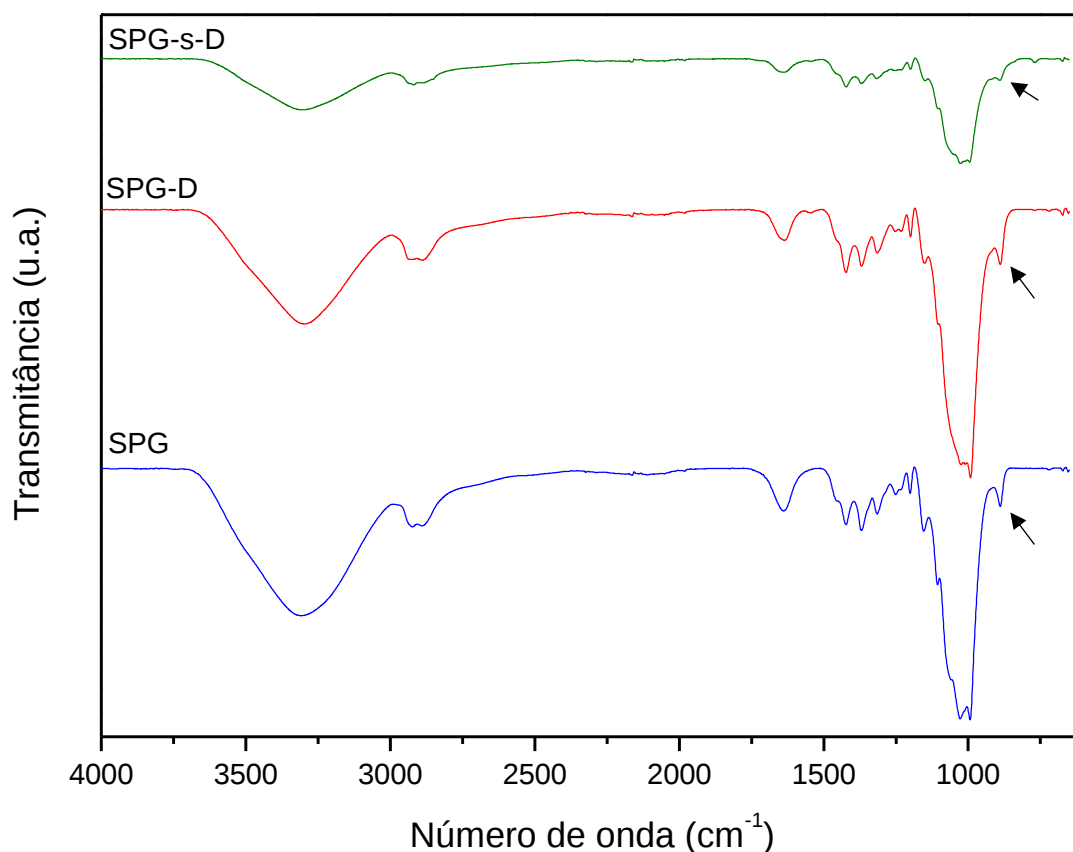
4.2.2 Caracterização do EPS de *S. commune* por FTIR, RMN, CG-MS e HPSEC

A análise de FTIR foi utilizada com intuito de identificar os grupos funcionais presentes no polissacarídeo conhecido como esquizofilano (SPG), pertencente à família das β-(1→3)-glucanas com ramificação em O-6 distribuídas regularmente a cada três unidades da cadeia principal (RAU, 1999).

O espectro de FTIR do polissacarídeo fúngico (Figura 17) apresenta uma banda por volta de 3200 cm⁻¹ atribuída ao estiramento da ligação O-H. Bandas na região entre 3200–3600 cm⁻¹ estão atribuídas a banda do grupo funcional OH e sinais encontrados em torno 2900 cm⁻¹ são atribuídas às vibrações de estiramento C-H para o SPG (JAMSHIDIAN *et al.*, 2016; MOHAMMADI *et al.*, 2018; MOUSAVIASL *et al.*, 2018; SAFAEE-ARDAKANI *et al.*, 2019). Duas regiões espectrais são importantes para a caracterização estrutural de polissacarídeos, a “região de açúcares” (1.200-950 cm⁻¹) e “região anomérica” (950-750 cm⁻¹) (SYNYTSYA; NOVAK, 2014). Bandas próximas de 890 cm⁻¹ foram encontradas para todas as amostras analisadas (Figura 17), típicas de configuração β dos carbonos anoméricos (DALONSO *et al.*, 2021). Em termos de perfil do espectro, o SPG-D apresentou maior semelhança ao SPG comercial. Os

polissacarídeos podem conter impurezas e também sais que são removidos por diálise. Portanto, o polissacarídeo dialisado apresentou-se mais semelhante ao disponível comercialmente.

Figura 17 – Espectro de FTIR dos exopolissacarídeos de *S. commune* de SPG, SPG-s-D e SPG-D; destaque para a banda em torno de 890 cm^{-1} (seta)



Para corroborar com os resultados de FTIR e confirmar que o material resultante obtido do cultivo do fungo *S. commune* trata-se do SPG, a análise de RMN (Figura 18) também foi realizada. Os espectros de RMN- ^{13}C de SPG e SPG-D foram bastante semelhantes e apresentaram sinais em δ 102,81 e 102,71 ppm que representam a região anomérica da estrutura, indicando a presença de configurações em β . O SPG e o SPG-D apresentaram sinais característicos de substituição O-3 (δ 86,50/86,14/85,83 ppm) e em O-6 (δ 68,47/68,47/68,23 ppm), assim como, a presença de unidades de C-6 não ligadas, correspondentes a $-\text{CH}_2$ (sinais do DEPT). Os polissacarídeos foram também analisados por *heteronuclear single-quantum correlation*-RMN (HSQC-RMN, Figura 19). O espectro de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do SPG-D mostrou correlações em δ 102,7/4,55 e 102,8/4,24 ppm atribuídas a C1/H1 das unidades de glucose3-O-substituídas e 3,6-di-O-

substituídas, respectivamente (MOHAMMADI *et al.*, 2018; SUTIVISEDSESAK *et al.*, 2013). Em azul mais claro (Figura 19) estão os sinais invertidos no experimento de DEPT (em detalhe) que correspondem ao C-6 livre ($-\text{CH}_2$).

A M_w do SPG-D foi de $1,093 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ e o valor do índice de polidispersão da amostra foi baixo ($1,059 \pm 0,014$). Resultado semelhante foi encontrado por Jamshidian *et al.* (2016) para o polissacarídeo de *S. commune* ATCC 38548, com uma M_w de $1,4 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$. No entanto, esse polissacarídeo apresentou índice de polidispersão maior (1,58) do que o encontrado no presente estudo. Sais inorgânicos, monossacarídeos, oligossacarídeos e substâncias apolares de baixa massa molar geralmente são removidos usando o método de diálise (SHI, 2016), o que implicaria menor distribuição de massa molar. No entanto, a M_w de um polissacarídeo pode ser determinada usando diferentes técnicas, e os resultados são dependentes do solvente e da abordagem utilizada. Além disso, a M_w também depende das condições de cultivo. Vanin *et al.* (2023) produziram EPS de *S. commune* 227E.32 em frascos e em reator agitados e encontraram M_w de $1,5 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ e $1,1 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$, respectivamente.

Figura 18 – Espectros de RMN- ^{13}C dos polissacarídeos de *S. commune*: A) SPG e B) SPG-D (em detalhe - ^{13}C -DEPT)

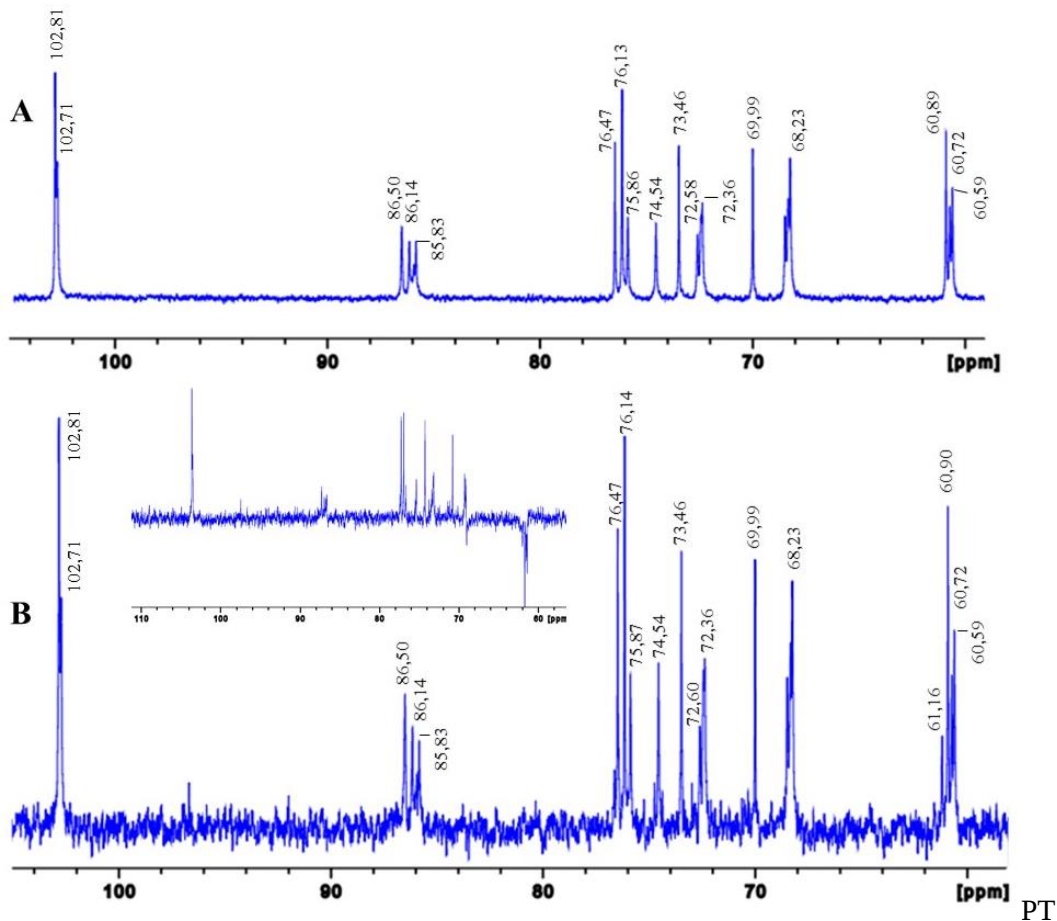
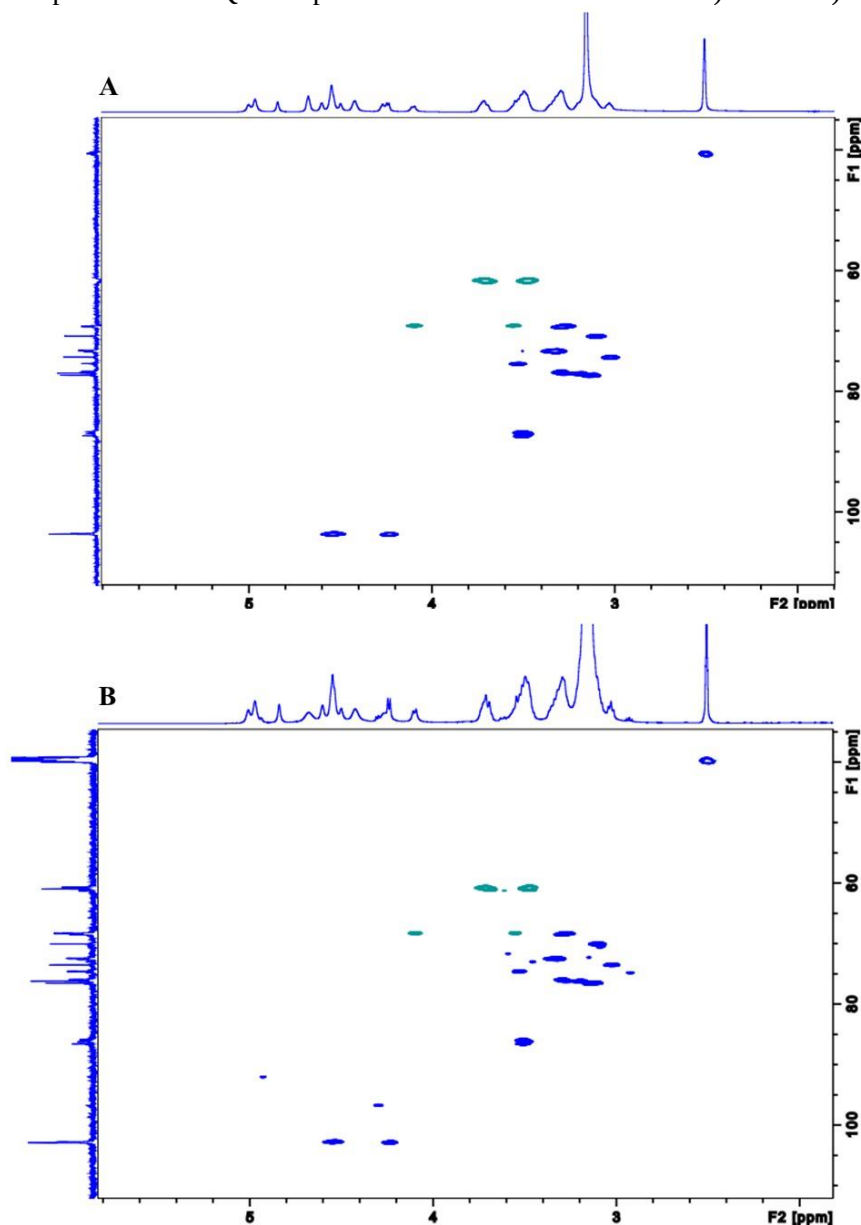


Figura 19 – Espectros de HSQC dos polissacarídeos de *S. commune*: A) SPG e B) SPG-D

Os SPG, SPG-s-D e SPG-D foram metilados e analisados por GC-MS a fim de identificar os tipos de ligações glicosídicas estabelecidas nas glucanas. Os resultados para SPG-s-D e SPG-D indicaram a presença de uma β -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada, semelhante ao SPG comercial (Tabela 2).

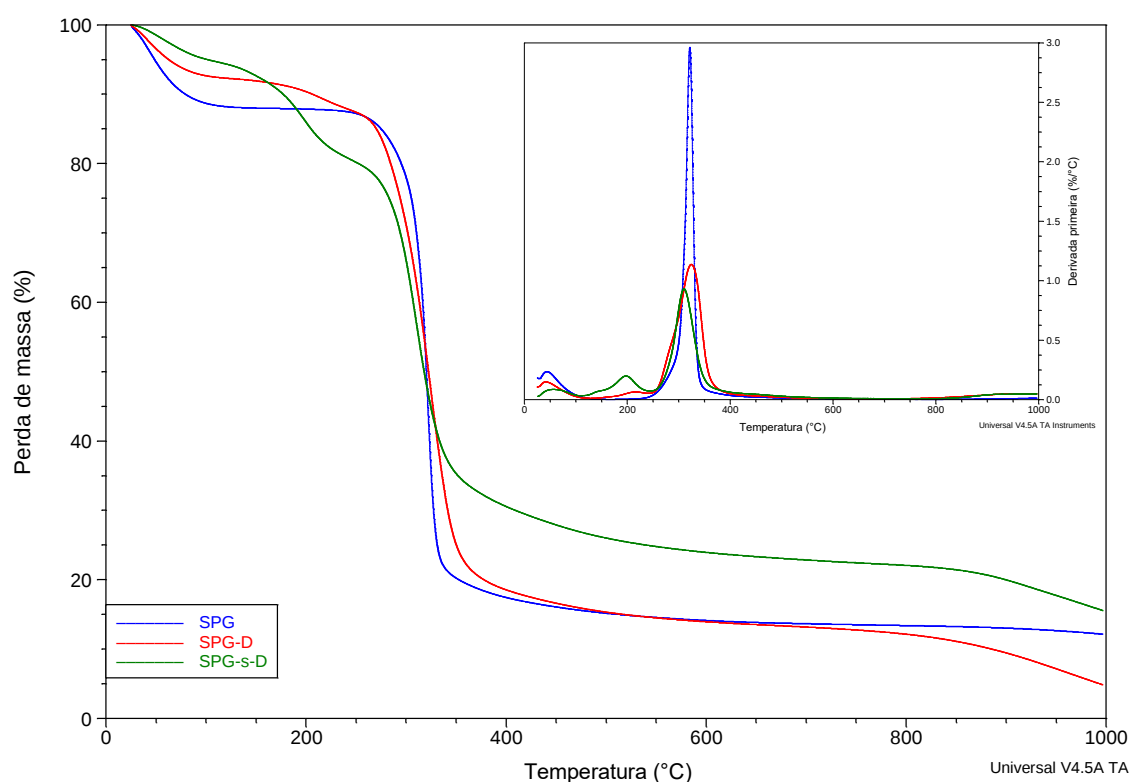
Table 2 - Análise dos derivados parcialmente O-metilados de SPG, SPG-s-D e SPG-D

Acetatos de glicosídeos parcialmente O-metilados	%			Tipo de ligação
	SPG	SPG-s-D	SPG-D	
2,3,4,6-Me ₄ -GlcOMe	18,81	23,92	21,95	Glc _p – (1 $\rightarrow$
2,4,6-Me ₃ -GlcOMe	54,43	48,85	51,47	3 $\rightarrow$ (-Glc _p – (1 $\rightarrow$
2,4-Me ₂ -GlcOMe	26,76	27,22	26,58	3,6 $\rightarrow$ (-Glc _p – (1 $\rightarrow$

4.2.3 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise térmica foi utilizada a fim de conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa do polissacarídeo e comparar o seu comportamento com a literatura. De acordo com a literatura, a decomposição térmica do SPG puro ocorre por volta de 310 °C (HAMED *et al.*, 2020). Em outro estudo, as curvas de TG/DTG mostraram que o SPG apresentou decomposição térmica em 307 °C (ABDEL-MOHSEN *et al.*, 2014). Neste trabalho, o SPG-s-D apresentou decomposição térmica máxima ($T_{máx}$) em 310 °C e para o SPG-D a temperatura subiu para 324 °C. Para o SPG a $T_{máx}$ está em aproximadamente 322 °C. Observou-se que a diálise, além de contribuir com aumento da estabilidade térmica do polissacarídeo, influenciou na diminuição do percentual de resíduo ao final da curva TG (1000 °C) apresentando diferença de 68% como pode ser visualizado na Figura 20.

Figura 20 – Curvas TG e DTG dos polissacarídeos SPG, SPG-s-D e SPG-D



4.3 Conclusões

Nesta etapa do estudo foi possível obter o SPG de *S. commune* BRM 060008 com características semelhantes ao SPG disponível comercialmente. A cepa de *S. commune* BRM 060008 apresentou um rendimento máximo de EPS de $0,8 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1}$, concentração de biomassa de $3,2 \pm 0,21 \text{ g L}^{-1}$ e glucose residual de $1,8 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ em 10 dias de cultivo.

A análise de FTIR de amostras do EPS permitiu identificar grupos funcionais característicos do SPG. O perfil do espectro do SPG-D (dialisado) apresentou maior semelhança ao SPG comercial. A análise de RMN corroborou com os resultados de FTIR confirmando que o EPS obtido do cultivo do fungo *S. commune* trata-se do SPG.

Pela técnica escolhida para determinação de massa molar, obteve-se um polissacarídeo de M_w de $1,093 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ com baixo valor do índice de polidispersão ($1,059 \pm 0,014$).

A diálise pode ser uma alternativa para obtenção de um material de maior pureza como visualizado nas curvas TG/DTG.

CAPÍTULO 3

Modificação química superficial da celulose bacteriana (CB) com (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES) e preparação de biocompósitos

5 CAPÍTULO 3 - MODIFICAÇÃO QUÍMICA SUPERFICIAL DA CELULOSE BACTERIANA (CB) COM (3-AMINOPROPIL) TRIETOXISILANO (APTES) E PREPARAÇÃO DE MISTURAS

5.1 Materiais e métodos

5.1.1 Materiais

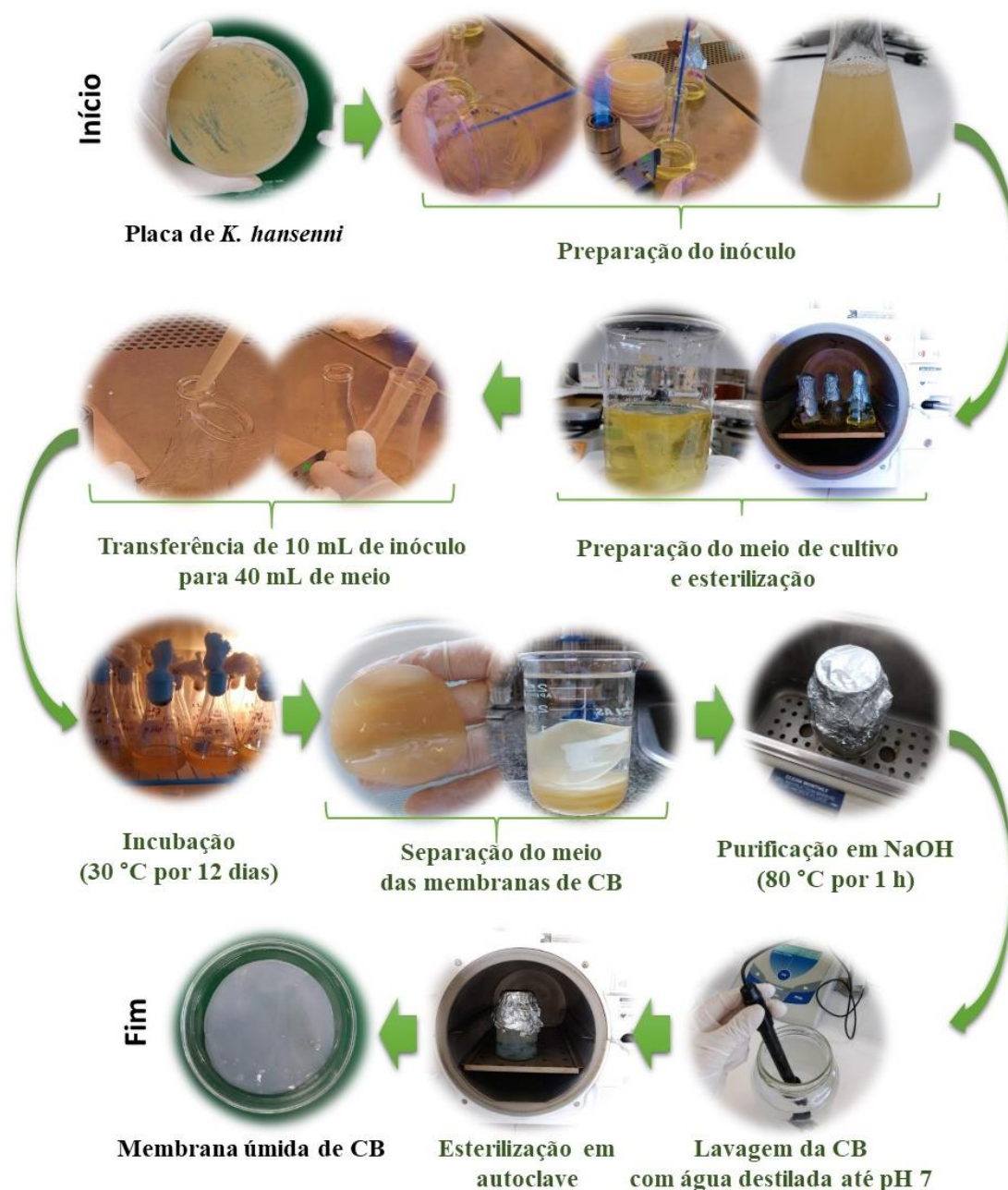
As membranas de celulose bacteriana (CB) foram produzidas no laboratório de Biotecnologia 1 (Biotec 1) da Universidade da Região de Joinville – Univille, utilizando a bactéria *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769. O (3-Aminopropil) trietoxisilano (APTES ou APTS) (99%) (CAS Number 919-30-2) foi adquirido 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. O SPG dialisado denominado como SPG-D obtido pelo cultivo submerso da cepa de *S. commune* BRM 060008 foi escolhido da sessão anterior deste estudo.

5.1.2 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 padrão HS adaptado de Hestrin e Schramm (1954), 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). 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 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 + 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 21 apresenta um esquema simplificado da metodologia de produção da CB.

Figura 21 – Etapas de produção das membranas de CB



5.1.3 Modificação química superficial da CB com APTES

Nesta etapa do trabalho 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 (Figura 22). Dentre os nove procedimentos testados, dois foram selecionados, os procedimentos 3 e 9. A seleção foi realizada com base nas características visuais e análises por FTIR. As amostras de CB que não apresentaram visível colapso de sua estrutura foram preferíveis, seguindo para o próximo passo da seleção pela identificação de grupos característicos de modificação química com aminosilano e mudanças na intensidade relativa das bandas, vistos por FTIR.

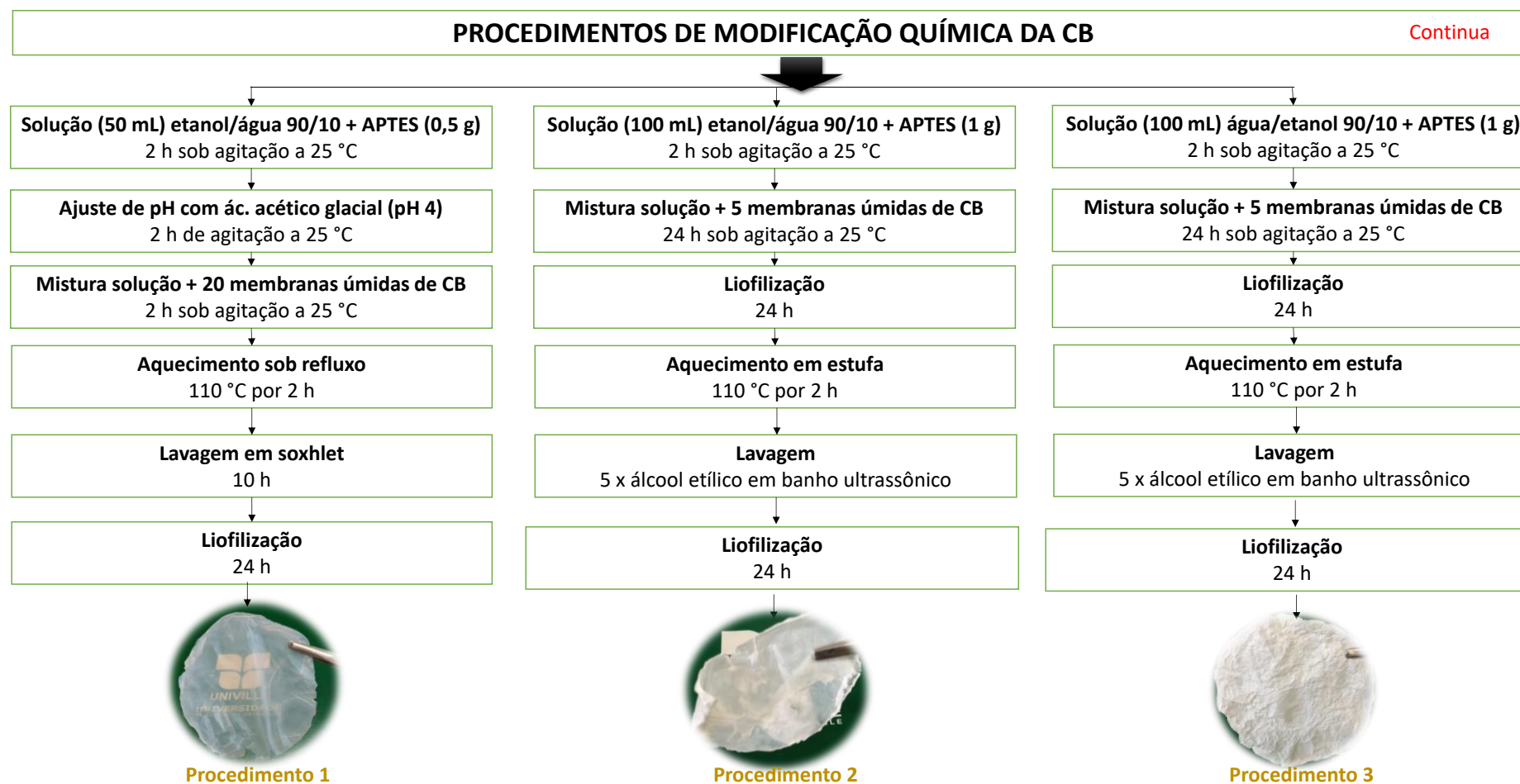
Os procedimentos 3 e 9 foram estudados com maior profundidade e consistem basicamente em: 1,0 g de APTES foi pré-hidrolisado em uma mistura de 100 mL de água destilada e etanol absoluto (99,8%) (90/10 v/v%) a temperatura ambiente por 2 h. Um total de 5 membranas úmidas purificadas de CB foram adicionadas 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 para 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 reidratação em etanol/água (70/30%), etanol/água (30/70%) e água destilada (100%) (*overnight*).

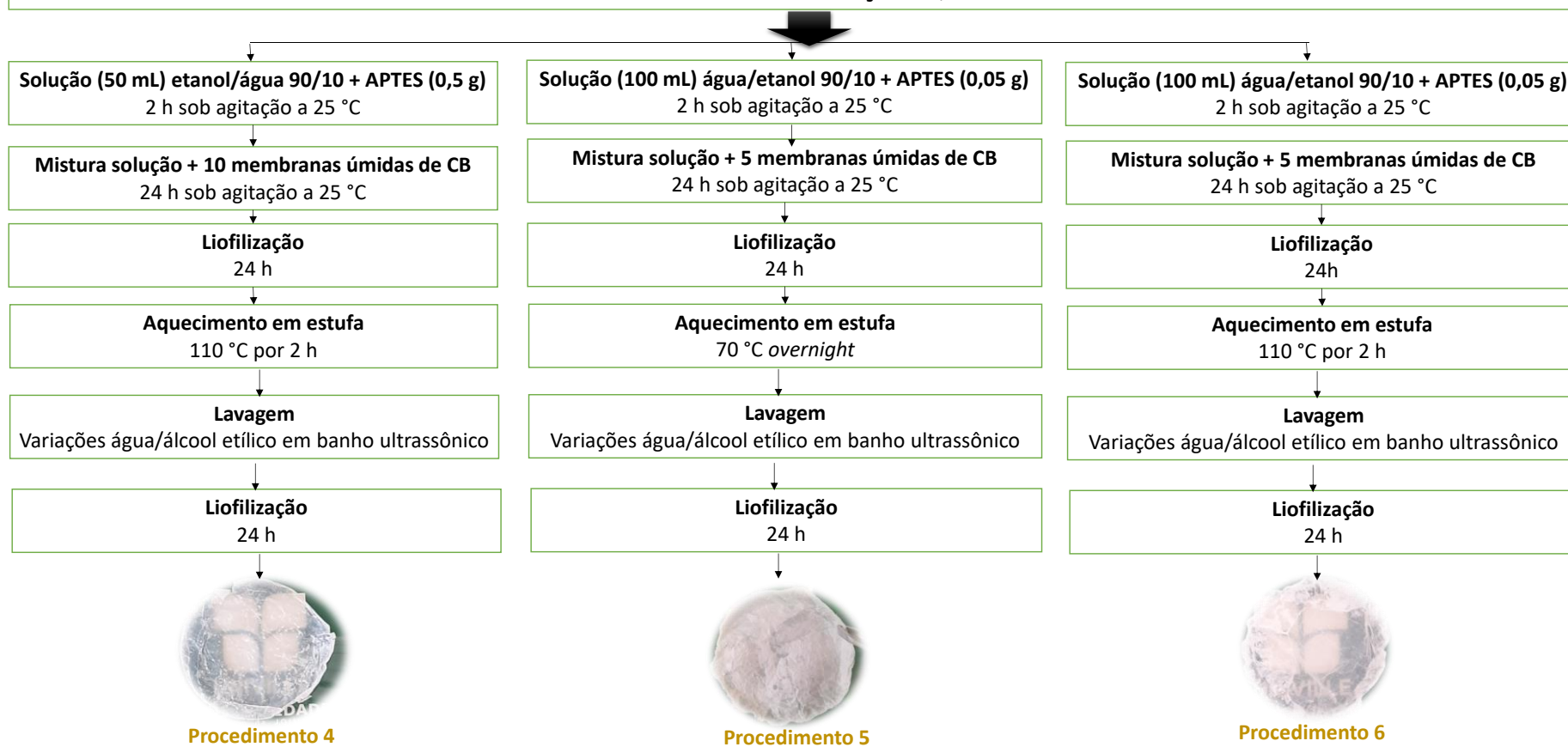
Posteriormente, as membranas foram congeladas, liofilizadas e acondicionadas em dessecador; denominadas de CBA P3 para a CBA do procedimento 3 e CBA P9 para a CBA do procedimento 9.

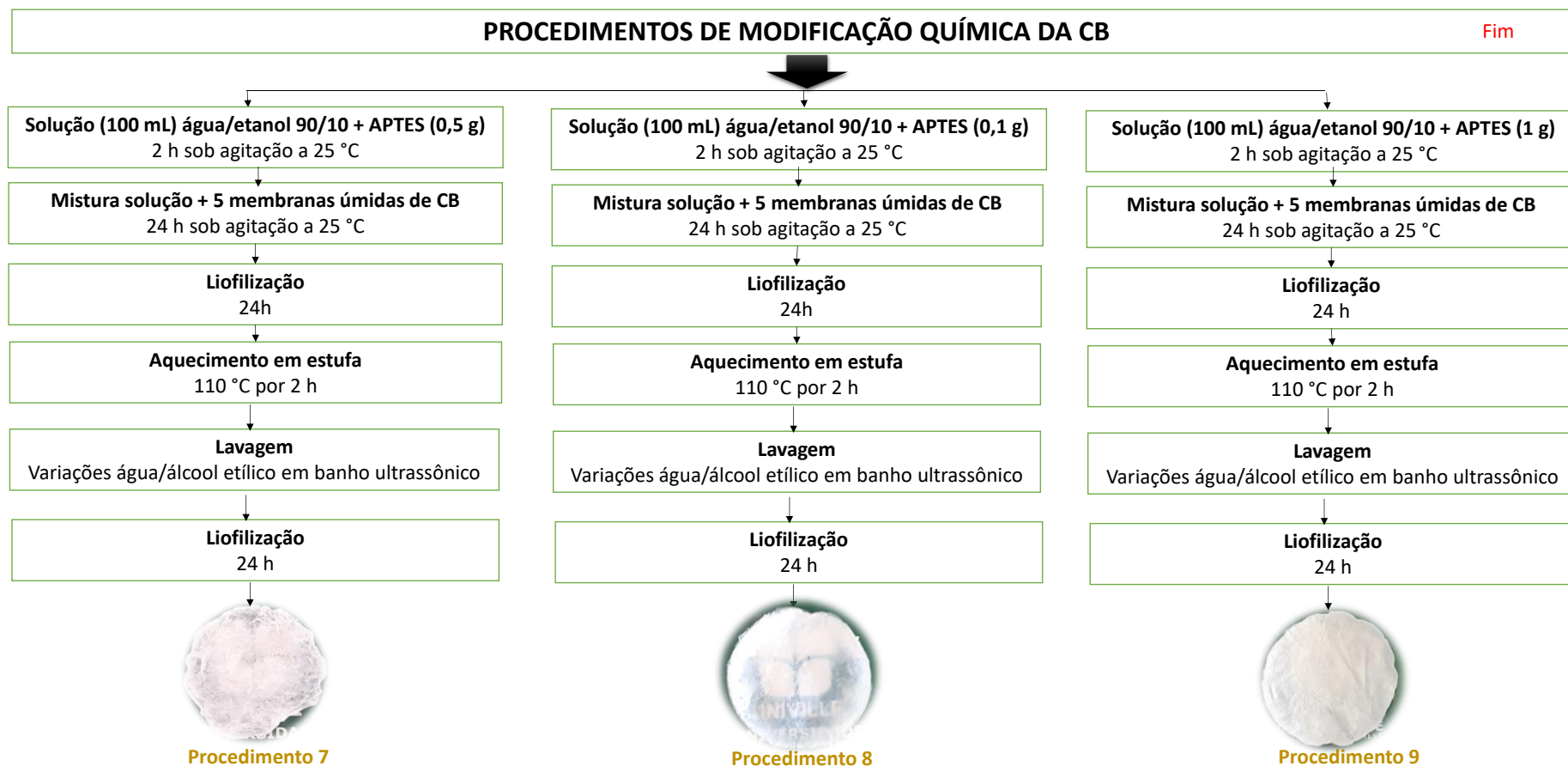
Figura 22 - Metodologias de modificação química superficial de membranas de CB com APTES



Continuação

PROCEDIMENTOS DE MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA CB





5.1.4 Incorporação de SPG e SPG-D em membranas de CB e CBA e reticulação com vanilina (VA)

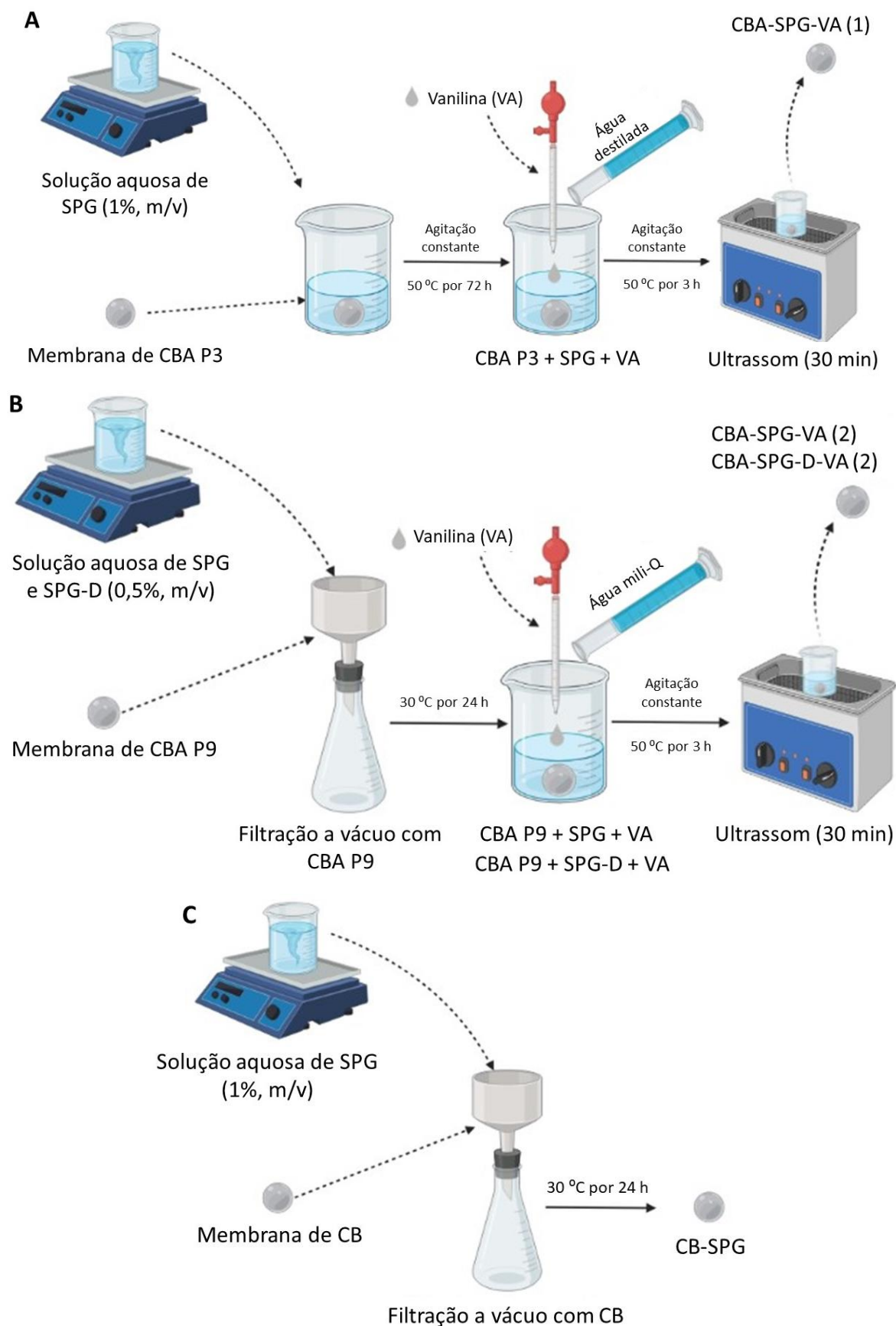
Na Figura 23 (elaborada no BioRender) estão representadas as etapas para a incorporação de SPG e SPG-D em membranas de CB e CBA e são descritas como:

- Metodologia 1: uma solução aquosa de SPG (1%, m/v) foi preparada. A membrana de CBA P3 foi molhada em 1 mL de solução aquosa de SPG, 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 (VA) (solução em etanol a 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 em ultrassom por 30 min, congeladas e liofilizadas. O material 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 de 2 mL das soluções aquosas de SPG e SPG-D, separadamente. 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 materiais 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 membrana de 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 material foi denominado CB-SPG. Não foi realizada a reticulação da amostra com vanilina.

Figura 23 – Desenvolvimento dos biocompósitos: **A)** Metodologias 1; **B)** Metodologias 2 e **C)** Metodologia 3



5.1.5 Caracterização

5.1.5.1 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).

5.1.5.2 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 α (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.

5.1.5.3 Ângulo de contato (AC)

As análises foram realizadas para as amostras de CB, CBA P3 e CBA P9 no laboratório de plasma, filmes e superfícies da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) em um goniômetro (Ramé-Hart Inst. Co. modelo 250-F1) pelo método de gota séssil, em que uma gota de água deionizada foi depositada sobre as amostras por meio de uma microseringa. Imagens foram obtidas e o ângulo de contato calculado.

5.1.5.4 Difratometria de Raios X (DRX)

Análises de DRX das amostras 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°/min e intervalo de 5° a 70° (2 θ).

5.1.5.5 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 micrografias obtidas por MEV com média de 10 medidas e desvio padrão.

5.1.5.6 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas (TGA) das amostras de CB, CBA P3, CBA P9 e dos 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 (N₂) em um porta amostra de platina.

5.2 Resultados e Discussão

5.2.1 Análise estrutural por FTIR

Na Figura 24 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. hansenii* (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 CBA P3 tornou-se mais ampla, o que pode ser atribuído à sobreposição com o sinal de vibração de estiramento de NH₂ (HAMED *et al.*, 2020; HAMED; SHOJAOSADATI, 2021). A banda por volta de 2900 cm⁻¹ da CB é atribuída ao estiramento C-H de grupos CH₂ e CH₃ (WANG *et al.*, 2018). O incremento da banda em torno de 2900 cm⁻¹ para a CBA P3 pode estar associado às vibrações CH₂ da porção propil do 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) da CB (WANG *et al.*, 2018). Bandas nas regiões de 1000-1200 cm^{-1} estão relacionadas com vibrações de estiramento C-O-C- e C-O (ATYKYAN; REVIN; SHUTOVA, 2020). 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 1480 e 1560 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; HAMED I *et al.*, 2020; SAINI; BELGACEM; BRAS, 2017). Porém, esses resultados de FTIR devem ser avaliados conjuntamente com outras técnicas porque bandas próximas dessas regiões podem ser características de estruturas de proteínas (aminoácidos), lipídios, metabólitos, biomassa residual de bactérias e/ou compostos do meio de cultura presos entre as fibrilas da CB (VASCONCELOS *et al.*, 2020). A presença de ligações Si-O-celulose, que correspondem à condensação dos grupos hidroxila do derivado de silano com os grupos hidroxila da CB, e silanóis (-Si-O-Si-) que reagem entre eles mesmos, 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 do anel piranósico da CB (FERNANDES *et al.*, 2013). 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) (HAMED I *et al.*, 2020; HAMED I; SHOJAOSADATI, 2021).

Comparando os filmes de CBA-SPG-VA (1) com CBA P3, as bandas em torno de 1560 e 1480 cm^{-1} desapareceram, sendo um indicativo da efetiva reticulação 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). Para confirmar a ação do agente reticulante, a característica chave é a formação de base de Schiff com ligações do tipo C=N, pela reação entre o grupo carbonila da vanilina e o grupo amino da CB amino-funcionalizada. A identificação da presença de SPG na amostra CBA-SPG-VA (1) fica de difícil visualização nos espectros em decorrência da sobreposição de várias bandas, principalmente, por ser uma mistura de CB e SPG que são dois polissacarídeos de glucose em configuração β .

Nas Figuras 25A e 25B estão apresentados os espectros de FTIR da CB, CBA P9, CBA-SPG-VA (2) (A) e CBA-SPG-D-VA (2) (B). Para a amostra CBA P9 pode-se observar mudança na intensidade relativa na região de ligação C-O-C do anel piranósico da celulose (identificado

por seta). Porém, as bandas características de grupos NH_2 não são bem definidas (bandas em torno de 1600 cm^{-1}), sugerindo que não tenha ocorrido a modificação com o aminosilano. Mesmo diante da possibilidade da não modificação química com aminosilano de CBA P9, optou-se por dar andamento nos estudos devido a maior homogeneidade e qualidade das amostras. Em relação a incorporação do SPG e SPG-D, observou-se que os espectros dos biocompósitos apresentaram perfis diferentes conforme lado da amostra avaliado, já que a CB possui densidade de fibras diferentes conforme o lado em contato com a superfície meio de cultivo/ar. A ligação β característica do SPG encontra-se na faixa de $884\text{-}892\text{ cm}^{-1}$ (HAMEDI *et al.*, 2020) e ficaram de difícil definição nos espectros.

Na Figura 26A estão apresentados os espectros de FTIR da CB e CB-SPG. Para a amostra de 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 (amostra - lado 1) indicando a incorporação do SPG. O perfil dos espectros de SPG e CB-SPG são bastante semelhantes (Figura 26B), apresentando as bandas 1029 (ligação C-O do anel de piranose), 997 e 891 cm^{-1} (C-H β -piranosídeos), indicando a bem-sucedida incorporação do SPG na matriz de CB (SAFAEE-ARDAKANI *et al.*, 2019)

Figura 24 - Espectros de FTIR da CB (a), CBA P3 (b), CBA-SPG-VA (1) – lado 1, (c) e CBA-SPG-VA (1) – lado 2 (d)

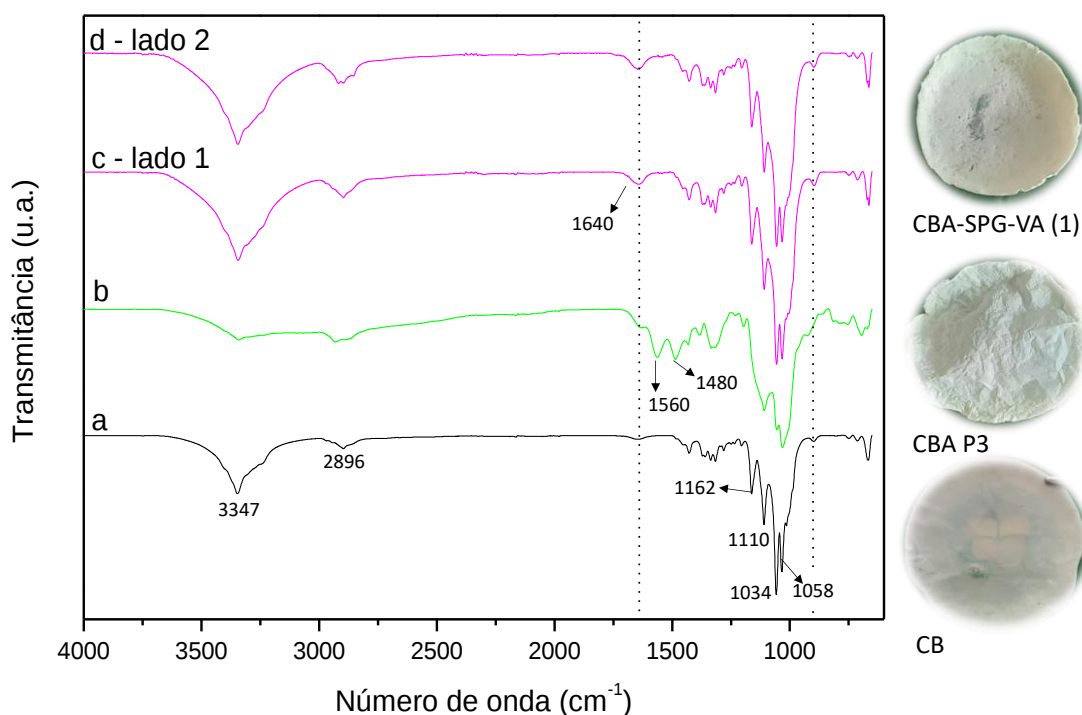


Figura 25 - Espectros de FTIR da **A)** CB (a), CBA P9 (b), CBA-SPG-VA (2) – lado 1 (c), CBA-SPG-VA (2) – lado 2 (d) e **B)** CB (a), CBA P9 (b), CBA-SPG-D-VA (2) – lado 1 (c), CBA-SPG-D-VA (2) – lado 2 (d)

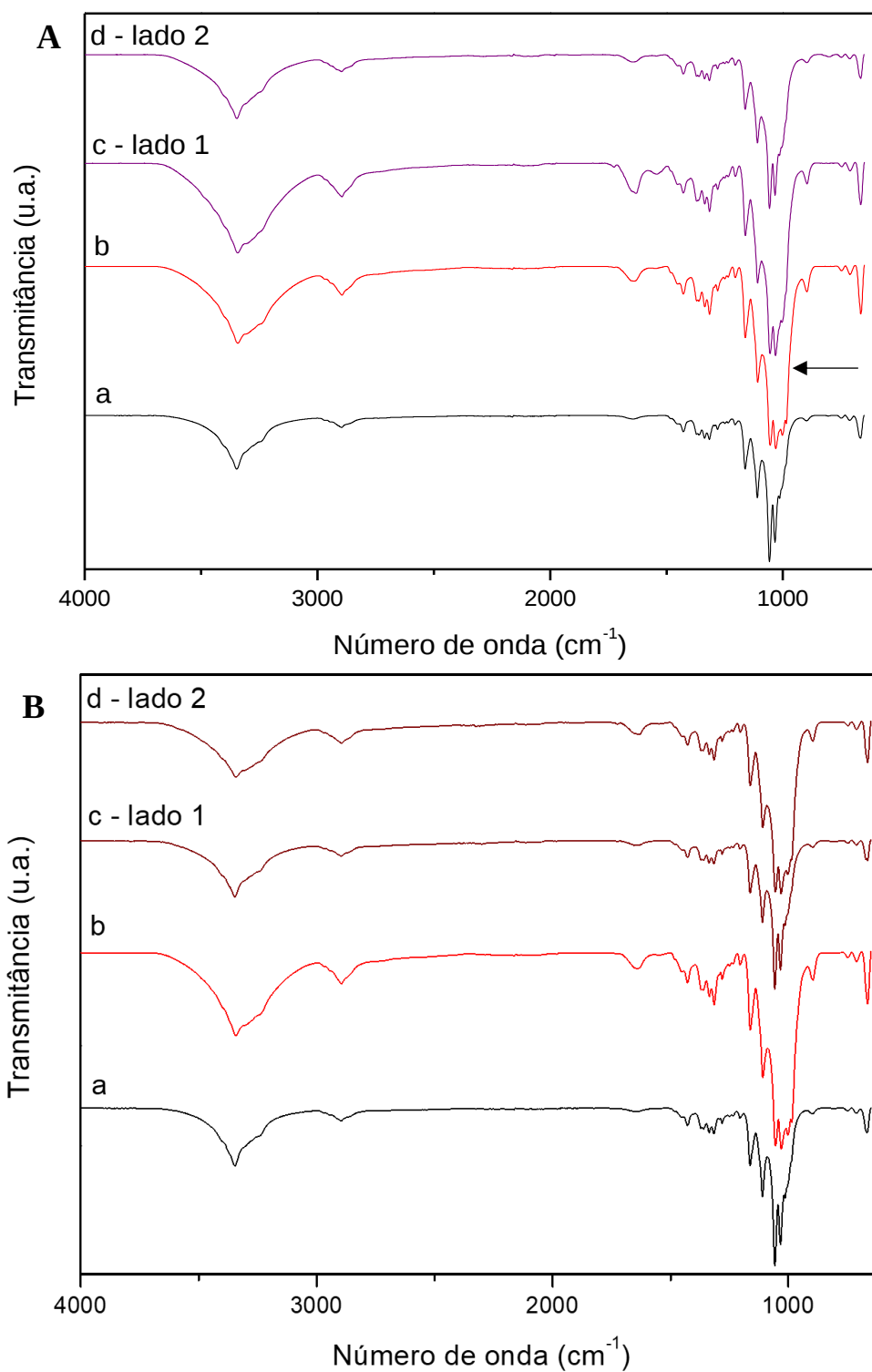
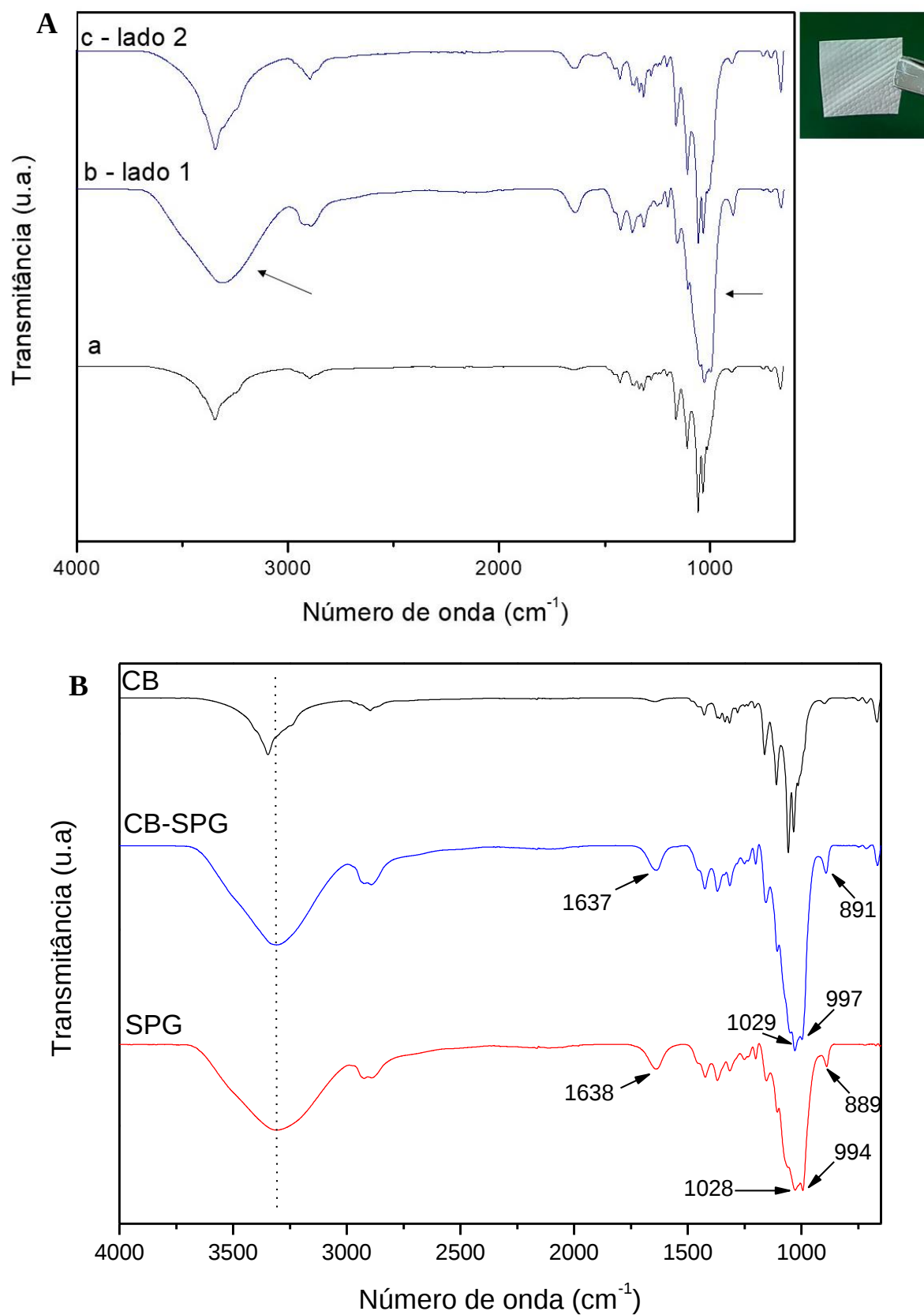


Figura 26 - Espectros de FTIR da **A)** CB (a), CB-SPG – lado 1 (b) CB-SPG – lado 2 (c) e **B)** CB, SPG e CB-SPG



5.2.2 Análise XPS

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 APTES. 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) (Tabela 3); entretanto, esses elementos não deveriam estar presentes (destacados em vermelho na Tabela 3). O pico de nitrogênio (N) para a CB (Tabela 3) poderia ser explicado se algum resíduo de meio de cultivo ainda estive presente entre o emaranhado de fibras da CB. Na Figura 27, 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 APTES, confirmando suspeita por FTIR.

Figura 27 – Espectros XPS das membranas de CB, CBA P3 e CBA P9

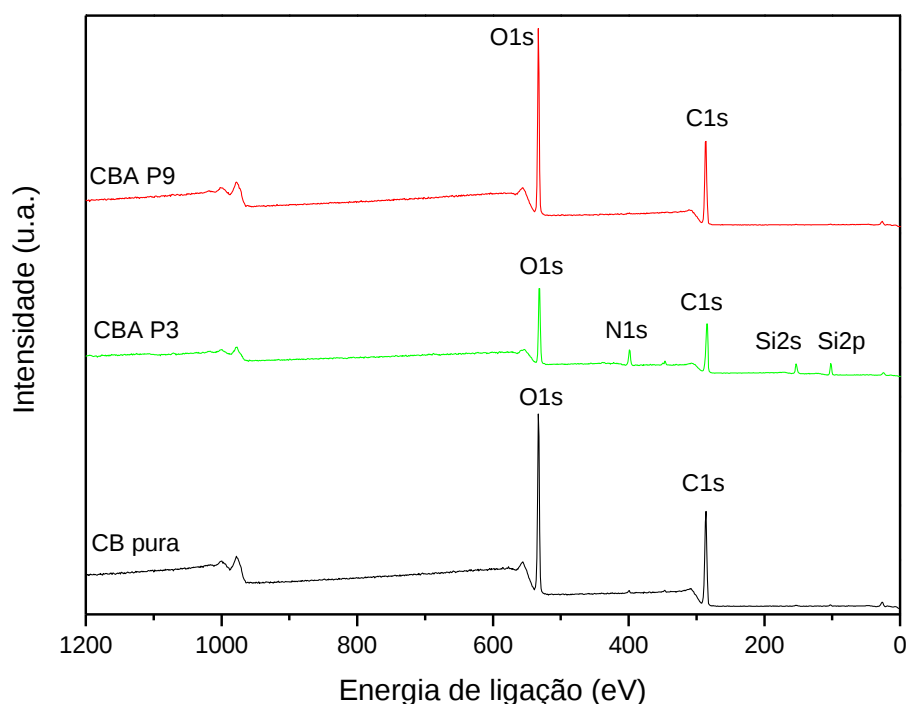


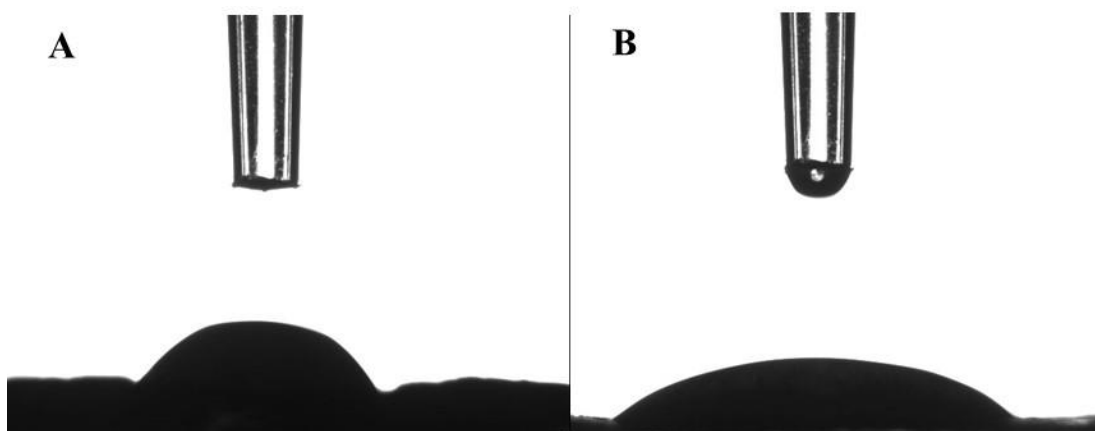
Tabela 3 – Concentração atômica de elementos (%) da análise de XPS da superfície de membranas de CB e CB modificadas

Amostras	Concentração atômica (%)						O/C
	O1s	C1s	N1s	Si2p	Ca2p	F1s	
CB	39,39	58,79	1,07	0,75	-	-	0,67
CBA P3	28,55	51,42	9,29	9,02	0,87	0,86	0,56
CBA P9	41,11	58,47	-	0,42	-	-	0,70

5.2.3 Ângulo de contato (AC)

O comportamento da molhabilidade da superfície das membranas de CB, CBA P3 e CBA P9 foi investigado por medidas de ângulo de contato (AC) pelo método da gota sésil. O grau de hidrofiliicidade e porosidade das membranas de CB determinam a absorção de gotículas de água durante a medição de AC (FRONE *et al.*, 2018). As medições de AC para a CB foram de difícil obtenção, pois ocorreu espalhamento total da gota de água sobre a superfície das amostras, resultando em ângulo zero. Na literatura é possível encontrar valores de AC para a CB variando entre cerca de 30° a 48° (FRONE *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2020; SHAO *et al.*, 2017). Esperava-se que após a funcionalização, as membranas de CBA P3 e CBA P9 se tornassem mais resistentes à água e as gotas permanecessem por mais tempo em sua superfície. A amostra CBA P3 apresentou aumento do ângulo de contato (Figura 28) devido à ligação covalente com grupos hidrofóbicos aminoalquilsilano. O AC da água sobre a membrana CBA P3 foi de aproximadamente 58°. A medida de CBA P9 foi de difícil apuração.

Figura 28 – Método da gota sésil para a medida de AC das amostras: **A)** CBA P3 e **B)** CBA P9



5.2.4 Análise morfológica por MEV

As morfologias da superfície das membranas de CB, CBA P3, CBA P9 e dos biocompósitos estão apresentadas na Figura 29 e auxiliam na identificação de mudanças na estrutura e porosidade das membranas, assim como, na identificação da presença do polissacarídeo fúngico em matriz de CBA. Na Figura 29A já bem estabelecido na literatura, visualiza-se para a CB uma estrutura de rede tridimensional (3D) bem-organizada e uma morfologia porosa (KIM *et al.*, 2011) com uma rede de nanofibrilas espaçadas características da CB liofilizada (CACICEDO *et al.*, 2020). A imagem da amostra de CBA P3 (Figura 29B) em comparação com a CB indica que a metodologia de modificação com APTES usada acarretou 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 micrografia de MEV mostrou que a amostra CBA P9 (Figura 29C) apresentou um perfil de fibrilas mais homogêneo quando comparada a CB, porém sem a cobertura observada na Figura 29B. A avaliação da espessura média das fibrilas de CB e CB amino-funcionalizadas foi conduzida utilizando o software ImageJ de processamento de imagens nas micrografias de MEV. Mudanças nos valores médios das fibrilas em relação a CB ($0,06 \pm 0,02 \mu\text{m}$) confirmaram o espessamento das fibrilas de CBA P3 ($0,08 \pm 0,02 \mu\text{m}$) indicando possível modificação estrutural. A membrana CBA P9 indicou apresentar maior homogeneidade com valor média de espessura de $0,03 \pm 0,01 \mu\text{m}$.

Analizando a imagem nas micrografias de MEV da amostra de CBA P3 (Figura 29B) não foi possível visualizar mudanças significativas na rede polimérica pela a adição da solução aquosa de SPG (1% m/v). Para o filme CBA-SPG-VA (1), existe uma tendência de incremento na porosidade quando comparado a micrografia de CBA P3, evidenciado pelo espaçamento entre as fibrilas. Este fato foi também percebido por análise visual, evidenciando que a reticulação química com VA contribui para a recuperação da amostra em termos de porosidade, uma vez que não fica clara a influência da incorporação com SPG.

Em um estudo anterior, 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

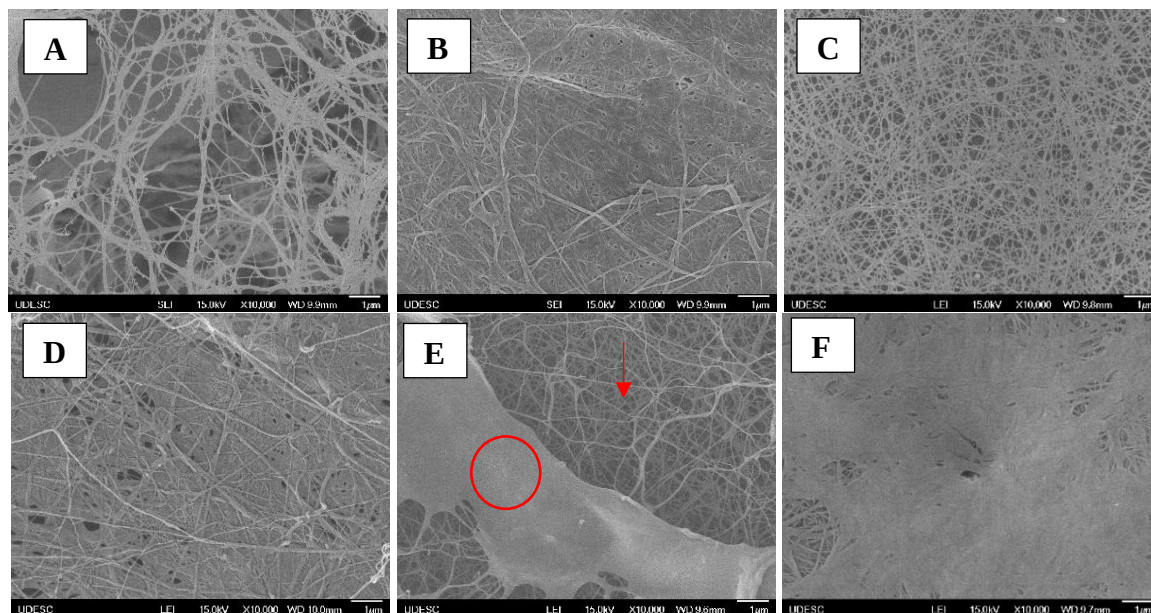
significativamente alterada pelo acúmulo de SPG. Já neste trabalho, não se observou esta tendência de preenchimento, o que pode ser influenciado pela quantidade de SPG utilizada. Micrografias de MEV e a análise visual indicam uma tentativa de retorno da membrana de CBA-SPG-VA (1) a uma condição esponjosa da CB liofilizada.

O entendimento da morfologia das membranas é de fundamental importância e permite compreender melhor outros parâmetros como a capacidade de absorção de líquidos. Hamed *et al.* (2020) observaram que a CB amino-funcionalizada mostrou menor capacidade de absorção de água em relação a CB decorrente de sua superfície se apresentar mais compacta e com menor porosidade (visualizado por MEV), influenciando a penetração de moléculas de água. Entretanto, a incorporação do SPG que é altamente hidrofílico, intensificou a absorção de água dos compósitos de CB amino-funcionalizada e SPG.

Safae-Ardakani *et al.* (2019) prepararam mantas de nanofibras de PVA-SPG por eletrofiação e constataram que a absorção de água foi incrementada com o aumento da quantidade de SPG. Esse aumento de absorção de água pode estar associado à existência de mais grupos OH nas amostras com quantidades maiores de SPG, resultando em sítios adicionais de ligação de hidrogênio e também devido à natureza hidrofílica da β -glucana. Para a aplicação das membranas como curativo, a capacidade de absorção de líquidos é fundamental, uma vez que um bom curativo deve ser capaz de absorver os exsudatos da ferida; no entanto, não deve ser tão absorvente para levar a ferida a secar, nem tão denso que não possa absorver uma pequena quantidade de exsudados.

Na Figura 29E-F estão as micrografias dos biocompósitos resultantes da Metodologia 2. A membrana CBA P9 mostrou uma distribuição mais homogênea de fibrilas, que foram cobertas pelo SPG em determinados pontos da membrana. Como o SPG foi incorporado em uma quantidade em massa de 50% em relação a massa de CB para todas as misturas, não seria possível que toda a amostra estivesse coberta com o SPG. A Figura 29E mostra que o SPG está presente na superfície da CBA, 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). A Figura 29F mostra uma cobertura quase que total do SPG-D na matriz de CBA P9.

Figura 29 – Micrografias de MEV de superfície de CB e CBA com aumento de 10.000×: **A)** CB, **B)** CBA P3, **C)** CBA P9, **D)** CBA-SPG-VA (1), **E)** CBA-SPG-VA (2) e **F)** CBA-SPG-D-VA (2)

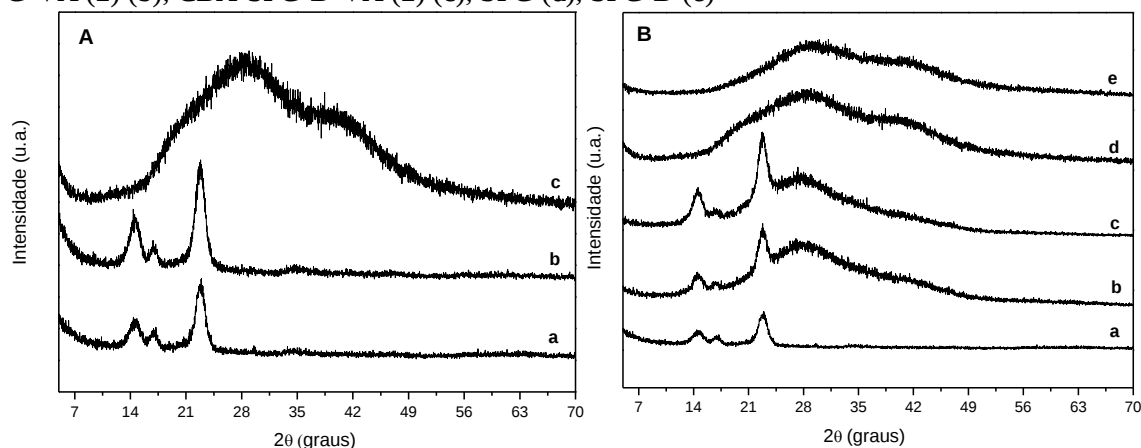


5.2.5 Análise por DRX

Os biocompósitos foram estudados por DRX a fim de analisar as alterações causadas pela incorporação de SPG e SPG-D na rede de CBA (Figura 30). Similar a literatura, a CB apresentou ângulos de Bragg em $2\theta = 14,5^\circ$, $16,9^\circ$ e $22,9^\circ$ característico deste polímero (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 30A - espectros a e b), o que não corrobora com os resultados obtidos por Hamed; Shojaosadati (2021) em que constatarem 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. Outro ponto importante a ser observado, é que a presença do pico agudo em $5,7^\circ$ (2θ) característico do SPG (HAMEDI *et al.*, 2020; MISHIMA *et al.*, 1998) não está presente no SPG comercial e tão pouco nos biocompósitos, assim como, o pico em torno de 20° (2θ) (ABDEL-MOHSEN *et al.*, 2014) está deslocado para frente, localizado em aproximadamente 28° (2θ). Esses resultados podem indicar incorporação do SPG dentro da rede de CB não bem-sucedida. Na Figura 30B alterações nos espectros dos biocompósitos pela incorporação do SPG (b) e SPG-D (c) na matriz de CBA P9 podem ser visualizadas. Picos

largos em torno de 28° (2θ) aparecem para os biocompósitos, indicando a presença de SPG e SPG-D, mas novamente o pico em torno de $5,7^\circ$ (2θ) não foi identificado.

Figura 30 - Difrátogramas de raios de X: **A)** CB (a), CBA-SPG-VA (1) (b), SPG (c) e **B)** CB (a), CBA-SPG-VA (2) (b), CBA-SPG-D-VA (2) (c), SPG (d), SPG-D (e)



5.2.6 Análise termogravimétrica (TGA)

Curvas TG das membranas de CB, CBA P3, CBA P9 e dos biocompósitos podem ser visualizadas na Figura 31. O estudo de degradação térmica das membranas de CB e CBA P3 e CBA P9 foi conduzido para melhor entendimento da estabilidade térmica e perfil de degradação das membranas funcionalizadas com APTES; e como um indicativo de efetiva modificação com aminosilano 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 $150\text{--}200^\circ\text{C}$; o segundo evento com maior perda de massa é observado em torno de 330°C (BARUD *et al.*, 2011; CACICEDO *et al.*, 2020). Na Figura 31 pode-se observar que a CB apresentou na faixa de 25°C a 150°C uma perda de massa de 3,4% relacionada principalmente a evaporação de água. Como as amostras neste trabalho foram previamente liofilizadas e acondicionadas em dessecador, apenas água fortemente ligada deveria estar presente neste primeiro estágio de degradação (CACICEDO *et al.*, 2020). Diferentemente, a CBA P3 apresenta dois eventos térmicos ocorrendo entre $25\text{--}150^\circ\text{C}$ (Figura 31A). Para a CBA P9 a perda de água foi de 4,8%. Desta forma, a modificação realizada com APTES não interferiu na afinidade da CB com água (FERNANDES *et al.*, 2013).

Uma queda brusca de massa próximo de 334°C (T_{onset}) é observada para a CB com perda de massa em torno de 86%, resultante da decomposição da amostra. Neste segundo evento, para todas as membranas ocorre a maior perda de massa (%). Esta queda em termos de

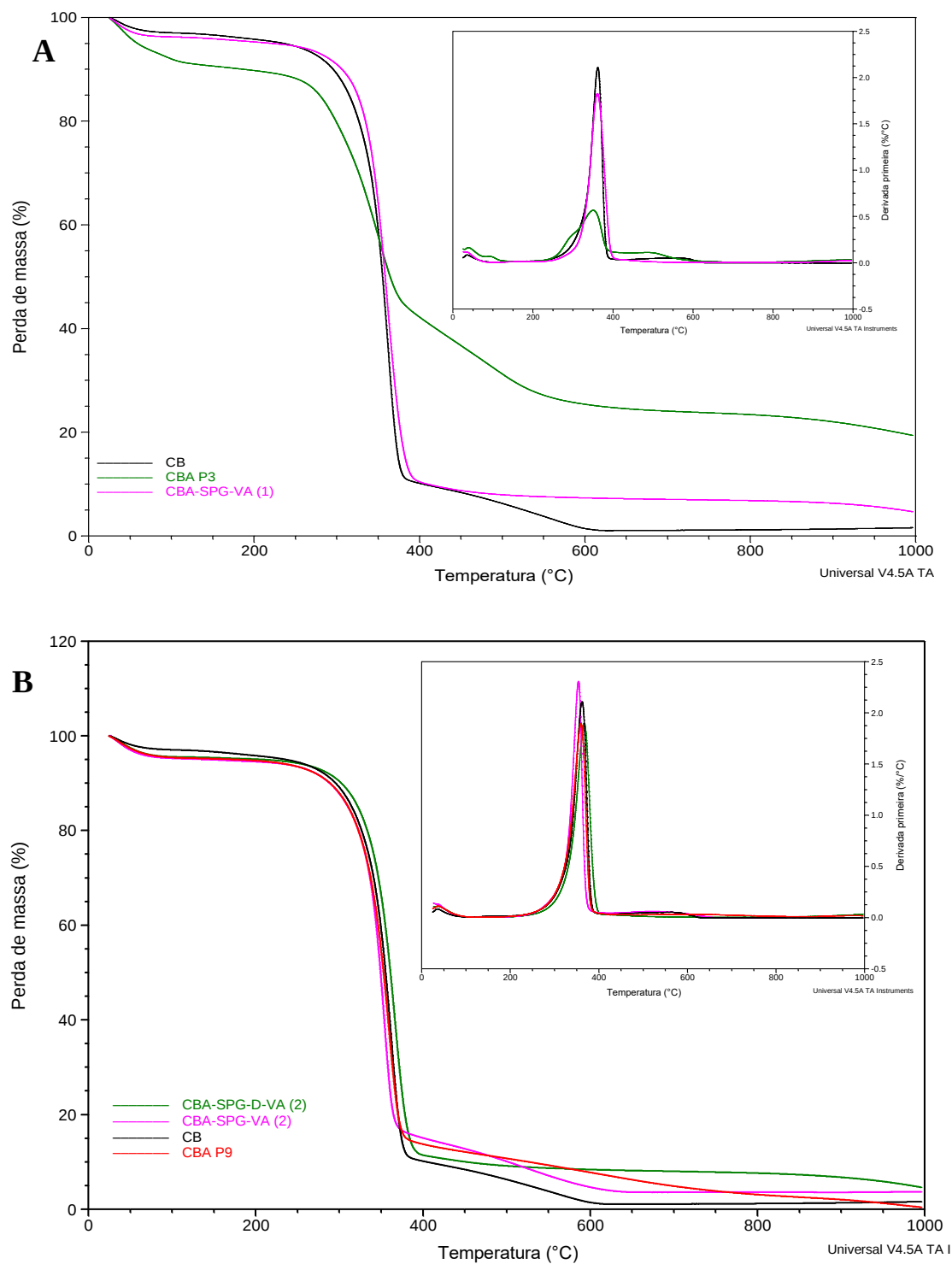
massa inicia-se em 295 °C para a CBA P3 e em 329 °C para a CBA P9 (Tabela 4). A diminuição da temperatura de início de degradação para a membrana CBA P3 é um indicativo de perda em estabilidade térmica de aproximadamente 12% quando comparada a CB. Para a CB, esse segundo evento de perda de massa é descrito na literatura como sendo a degradação da celulose, caracterizada pela despolimerização e decomposição de unidades glicosídicas (VASCONCELOS *et al.*, 2020). Este alto 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. Para a CBA P3, o segundo evento de perda de massa é seguido de um ombro em torno de 400 a 600 °C. As curvas DTG da CB, CBA P3 e CBA P9 mostraram que a temperatura máxima de degradação (T_{max}) ocorrem em 362 °C, 350 °C e 359 °C, respectivamente.

Nota-se que 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 molar (VASCONCELOS *et al.*, 2020). O percentual de resíduo da membrana CBA P3 em comparação a CB aumentou em aproximadamente 92%. Este aumento significativo pode ser um indicativo da bem-sucedida funcionalização da membrana de CB com APTES pela presença de SiO₂ (FERNANDES *et al.*, 2013). Para a CBA 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 a CB foram avaliados também por termogravimetria (Figura 31). A perda de massa inicial observada na faixa de temperatura de 25 a 150 °C está relacionada à perda de água. Neste primeiro estágio de perda de massa, as membranas de CB e das misturas apresentaram valores semelhantes de 3,4% para a CB, 4,1% para CBA-SPG-VA (1), 5,4% para CBA-SPG-VA (2) e 4,9% para CBA-SPG-D-VA (2); entretanto, existe uma tendência de aumento percentual de perda de massa para os biocompósitos em relação a CB (Tabela 4).

O início da principal perda de massa ocorreu em temperaturas mais baixas para os biocompósitos em comparação a CB; no entanto, para o filme de CBA-SPG-D-VA (2) foi levemente superior (Figura 31B). Ao final das curvas TG em 1000 °C, o percentual de resíduo inorgânico aumentou em comparação a CB. Esse incremento pode ser atribuído à presença de SiO₂ em função da modificação química com APTES ou a outros resíduos inorgânicos presentes em amostras de SPG, visto nas curvas TG das Figura 31A-C.

Figura 31 – Curvas TG/DTG das membranas: **A)** CB, CBA P3 e CBA-SPG-VA (1); **B)** CB, CBA P9, CBA-SPG-VA (2) e CBA-SPG-D-VA (2) e **C)** CB e CB-SPG



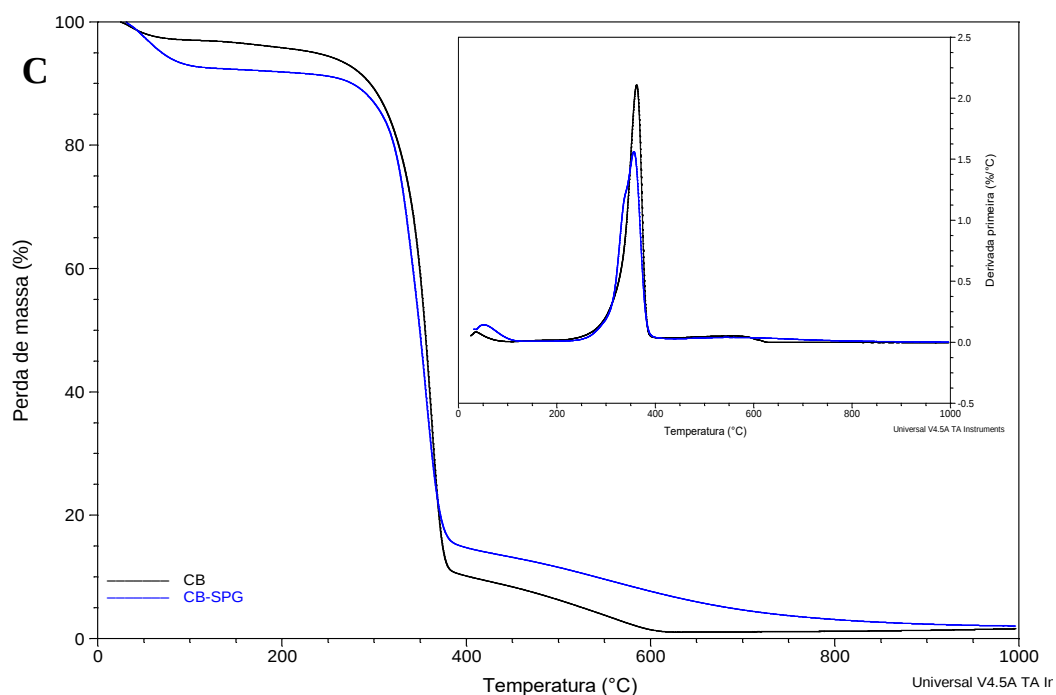


Tabela 4 – Principais dados obtidos das curvas TG/DTG da CB, CB amino-funcionalizadas e biocompósitos

Amostras	Dados das curvas TG e DTG			
	T _{onset} °C	T _{max} °C	Perda de massa %	Resíduo em 1000 °C %
CB	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
CBA-SPG-D-VA (2)	337,66	366,42	83,69	4,62
CB-SPG	322,30	355,88	77,57	2,07

5.3 Conclusões

Membranas de CB amino-funcionalizadas foram obtidas usando em maior concentração água destilada em relação ao aminosilano, sem ajuste de pH. Observou-se que mudanças na lavagem das membranas, dos procedimentos 3 e 9, influenciaram o resultado em termos de modificação. Perdas na porosidade foram observadas nas micrografias de MEV e influenciaram na molhabilidade da membrana de CB. A modificação com APTES acarretou em maior homogeneidade em relação ao tamanho de poros. Diante dos resultados, fica evidente que

ocorreram mudanças na amostra amino-funcionalizada do procedimento 3 (CBA P3) com a introdução de vanilina. A membrana apresentou aspecto esponjoso e aparentemente um retorno a porosidade mais próximo da CB.

Com a aplicação da metodologia 2, fica evidente a introdução do SPG na estrutura de CB P9, mesmo não ocorrendo a bem-sucedida modificação com aminosilano da amostra. Portanto, a metodologia 2 de preparação dos biocompósitos foi testada no desenvolvimento de CB-SPG e desenvolvida a metodologia 3. Na metodologia 3, a incorporação do SPG pode ser indicada por FTIR pelo similar perfil do espectro do biocompósito em relação ao SPG. Porém, e a incorporação do SPG ainda deve ser melhor investigada. Além disso, a análise visual mostrou que a combinação CB-SPG apresentou um aspecto visual interessante do ponto de vista comercial.

Desta forma, as metodologias testadas são complementares e podem ser unidas para obtenção de melhores resultados, conforme aplicação pretendida.

6 CONCLUSÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos por meio dos experimentos e análises realizados neste estudo, foi possível obter o polissacarídeo fúngico de *S. commune* BRM 060008, conhecido como SPG, muito similar ao disponibilizado comercialmente. Em seguida, pela modificação química superficial com aminosilano foi possível funcionalizar a CB por meio de uma metodologia adaptada (CBA P3).

A metodologia 1 de incorporação do SPG em matriz de CBA P3 não foi suficiente para o desenvolvimento de um biocompósito; no entanto, as análises de MEV e DRX comprovaram que o SPG estava na amostra CBA P9, mesmo que esta amostra não tenha sido efetivamente funcionalizada com aminosilano. Isto é um indicativo que a metodologia 2 pode ser utilizada a fim de incorporar o SPG na matriz de CB, como indicado na metodologia 3. Desta forma, entende-se que as metodologias de desenvolvimento de biocompósitos são complementares e que para obtenção de resultados mais favoráveis devem ser fundidas em uma única metodologia.

A efetiva incorporação de CB em SPG deve ser melhor investigada, principalmente devido a satisfatória característica visual atingida na metodologia 3. Estudos biológicos também devem ser realizados a fim de impulsionar aplicação como curativos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Testar meios alternativos e com baixo custo de produção do SPG.

Testar atividades biológicas do SPG obtido de *S. commune* BRM 060008.

Avaliar atividade antimicrobiana de CBA P3.

Testar outro agente de reticulação, como o cinamaldeído.

Testar atividade antioxidante dos materiais reticulados com vanilina.

Unir as metodologias testadas de modificação da CB com aminosilano e a de preparação de biocompósitos (metodologia 2).

Avaliar o comportamento mecânico e citotoxicidade dos biocompósitos.

Aplicar a metodologia do presente estudo a outros materiais de CB/biopolímeros solúveis em água.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOHSEN, A. M. *et al.* Preparation, characterization and cytotoxicity of schizophyllan/silver nanoparticle composite. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 1, p. 238–245, 2014.
- ADITYA, Teresa *et al.* Surface Modification of Bacterial Cellulose for Biomedical Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, 2022.
- ADUBA Jr, Donald C.; YANG, Hu. Polysaccharide fabrication platforms and biocompatibility assessment as candidate wound dressing materials. **Bioengineering**, v. 4, n. 1, 2017.
- AHMED, Jubair; GULTEKINOGLU, Merve; EDIRISINGHE, Mohan. Bacterial cellulose micro-nano fibres for wound healing applications. **Biotechnology Advances**, v. 41, 2020.
- ATYKYAN, Nelli; REVIN, Victor; SHUTOVA, Vitalina. Raman and FT-IR Spectroscopy investigation the cellulose structural differences from bacteria *Gluconacetobacter sucrofermentans* during the different regimes of cultivation on a molasses media. **AMB Express**, 2020.
- 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.
- BIONEXT, 2022. Bionext®. Disponível em: <<https://www.bennetthealth.net/wp-content/uploads/2020/10/Bionext-Brochure-02212019-Portuguese.pdf>>. Acesso em: 20, junho, 2022.
- BOHN, John A; BEMILLER, James N. (1-3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, p. 3–14, 1995.
- BOT, A. *et al.* Melting behaviour of schizophyllan extracellular polysaccharide gels in the temperature range between 5 and 20 °C. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, p. 363–372, 2001.
- BROWN, Adrian J. XLIII-On an Acetic Ferment which form Cellulose. **Journal of the Chemical Society**, v. 49, 1986.
- BROWN JR, R Malcolm; SAXENA, Inder M; KUDLICKA, Krystyna. Cellulose biosynthesis in higher plants. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 5, p. 149–156, 1996.
- 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.

CAZÓN, Patricia; VÁZQUEZ, Manuel. Improving bacterial cellulose films by *ex-situ* and *in-situ* modifications: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 113, 2021.

CHANDRA, R; RUSTGI, Renu. Biodegradable Polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 1273–1335, 1998.

CHAWLA, Prashant R *et al.* Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.

CIECHOLEWSKA-JUŚKO, Daria *et al.* Superabsorbent crosslinked bacterial cellulose biomaterials for chronic wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, v. 253, 2021.

CIUCANU L; KEREC F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, p. 209–217, 1984.

CONTIPRO, 2022. Schizophyllan Beauty from mushrooms – Disponível em: <<https://www.contipro.com/images/ProductLists/SCHIZOPHYLLAN.pdf>>. Acesso em: 14, junho, 2022.

COOKE, Wm. Bridge. The Genus Schizophyllum. **Mycologia**, v. 53, n. 6, p. 575–599, 1961.

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.

DALONSO, Nicole *et al.* Comparison of cell wall polysaccharides in *schizophyllum commune* after changing phenotype by mutation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, 2021.

DALONSO, Nicole. **Construção de plasmídeos visando modificação genética em fungos filamentosos de interesse biotecnológico**. 2018. Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente - Universidade da Região de Joinville (Univille), Joinville, 2018.

DALONSO, Nicole; GOLDMAN, Gustavo Henrique; GERN, Regina Maria Miranda. β -(1→3),(1→6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 7893–7906, 2015.

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.

ESA, Faezah; TASIRIN, Siti Masrinda; RAHMAN, Norliza Abd. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 113–119, 2014.

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.* Surface Treatment of Bacterial Cellulose in Mild, Eco-Friendly Conditions. **Coatings**, v. 8, n. 221, 2018.

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, Changhong. Application of a novel biopolymer to enhance oil recovery. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, v. 6, n. 4, p. 749–753, 2016.

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.

GfN-SELCO, 2022. Schizophyllan powder – Active agent gained from a fungus. Disponível em: <<https://www.gfn-selco.de/en/news/skin-care-plus>>. Acesso em: 14, junho, 2022.

GHORPADE, Vishwajeet Sampatrao. Preparation of hydrogels based on natural polymers via chemical reaction and cross-linking. **Hydrogels Based on Natural Polymers: Elsevier**, p. 91–118, 2020.

GOPI, S. *et al.* General scenarios of cellulose and its use in the biomedical field. **Materials Today Chemistry**, v. 13, 59-78, 2019.

GORGIEVA, Selestina. Bacterial cellulose as a versatile platform for research and development of biomedical materials. **Processes**, v. 8, n. 624, 2020.

GORGIEVA, Selestina; TRČEK, Janja. Bacterial cellulose: Production, modification and perspectives in biomedical applications. **Nanomaterials**, v. 9, p. 1352, 2019.

GRIP, Jostein *et al.* Beta-glucan-loaded nanofiber dressing improves wound healing in diabetic mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 121, p. 269–280, 2018.

GUIMARÃES, J. L. *et al.* Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 3, p. 407–415, 2009.

HAMED, 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.

HAMIDI, M. *et al.* Fungal exopolysaccharides: Properties, sources, modifications, and biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 284, 119152, 2022.

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.

HONG, Tao *et al.* Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis: Progress, challenge and perspective. **Food Chemistry: X**, v. 12, 2021.

HYDE, K. D.; BAHKALI, A. H.; MOSLEM, M. A. Fungi - An unusual source for cosmetics. **Fungal Diversity**, v. 43, p. 1–9, 2010.

ISLAM, Mazhar Ul *et al.* Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 1166–1173, 2017

ITOU T; TERAMOTO A. Isotope effect on the order-disorder transition in aqueous schizophyllan. **Carbohydrate Research**, v. 160, p. 243–257, 1987.

JAMSHIDIAN, Hajar *et al.* Characterization and optimization of schizophyllan production from date syrup. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 484–493, 2016.

KIKUMOTO, Shoichi *et al.* Polysaccharide Produced by *Schizophyllum commune* Part I. Formation and Some Properties of an Extracellular Polysaccharide. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, v. 44, p. 337–342, 1970.

KIM, Beom-Gi *et al.* Isolation and transformation of uracil auxotrophs of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 181, n. 2, p. 225–228, 1999.

KIM, Hye Lee *et al.* Evaluation of electrospun (1,3)-(1,6)- β -D-glucans/biodegradable polymer as artificial skin for full-thickness wound healing. **Tissue Engineering - Part A**, v. 18, n. 21–22, p. 2315–2322, 2012.

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.

KITAMURA, Shinichi *et al.* Conformational Transitions of Schizophyllan in Aqueous Alkaline Solution. **Biopolymers**, v. 39, p. 407–416, 1996.

KLEMM, Dieter *et al.* Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 1561–1603, 2001.

KLEMM, Dieter *et al.* Biotech nanocellulose: A review on progress in product design and today's state of technical and medical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 254, n. 15, 2021.

KLEMM, Dieter *et al.* **Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material.** *Angewandte Chemie*, v. 44, p. 3358 – 3393, 2005.

KLEMM, Dieter *et al.* Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today's state. **Materials Today**, v. 21, n. 7, p. 720–748, 2018.

KOIZUMI, S. *et al.* Bacterium organizes hierarchical amorphous structure in microbial cellulose. **European Physical Journal E**. 2008.

KOMATSU, Nobuhiko *et al.* Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *schizophyllum commune*. **GANN**, v. 60, p. 137–144, 1969.

KOROLENKO, Tatiana A.; BGATOVA, Nataliya P.; VETVICKA, Vaclav. Glucan and mannan—two peas in a pod. **International Journal of Molecular Science**, v. 20, 2019.

KUMAR, Sathish Sundar Dhillip *et al.* Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer-based biomaterials for wound healing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 165–175, 2018.

KUMAR, Maushmi S.; SINGHAL, Rekha S. Rheological Behavior of Schizophyllan in Fermentation System. **American Journal of Food Technology**, v. 6, n. 9, p. 781–789, 2011.

KUMARI, Maushmi; SURVASE, Shrikant A.; SINGHAL, Rekha S. Production of schizophyllan using *Schizophyllum commune* NRCM. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1036–1043, 2008.

LEATHERS, Timothy D. *et al.* Utilization of corn fiber for production of schizophyllan. **Biomass and Bioenergy**, v. 95, p. 132–136, 2016.

LEMIESZEK, Marta; RZESKI, Wojciech. Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. **Wspolczesna Onkologia**, v. 16, n. 4, p. 285–289, 2012.

LI, Qiu *et al.* Bioactive polysaccharides from natural resources including Chinese medicinal herbs on tissue repair. **Chinese Medicine**, v. 13, n. 7, 2018.

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.

LINDMAN, Björn; KARLSTRÖM, Gunnar; STIGSSON, Lars. On the mechanism of dissolution of cellulose. **Journal of Molecular Liquids**, v. 156, n. 1, p. 76–81, 2010.

LIU, Qingye *et al.* Progress in rigid polysaccharide-based nanocomposites with therapeutic functions. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, p. 5690–5713, 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, KnE Energy & Physics**, p. 202–211, 2018.

- LIYASKINA, E. *et al.* Nanomaterials from bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. **International Symposium Physics, Engineering and Technologies for Bio-Medicine**, v. 784, 2017.
- MACROCARE, 2022. MC-Glucan. Disponível em: <<http://macrocare.net/home/sub.php?menukey=73&mod=view&no=296&cate=00000009>>. Acesso em: 14, junho, 2022.
- MAJTAN, Juraj; JESENAK, Milos. β -Glucans: Multi-functional modulator of wound healing. **Molecules**, v. 23, n. 806, 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.
- MEFTAH, 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.
- MENG, Yan *et al.* Recent Advances in Chain Conformation and Bioactivities of Triple-Helix Polysaccharides. **Biomacromolecules**, v. 21, n. 5, p. 1653–1677, 2020.
- MISHIMA, Takashi *et al.* Adhesion β -D-glucans to cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 308, p. 389–395, 1998.
- MIZUNO, Masashi; NISHITANI, Yosuke. Immunomodulating compounds in Basidiomycetes. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 52, n. 3, p. 202–207, 2013.
- MOHAMED, Salah A.A.; EL-SAKHAWY, Mohamed; EL-SAKHAWY, Mohamed Abdel Monem. Polysaccharides, Protein and Lipid -Based Natural Edible Films in Food Packaging: A Review. **Carbohydrate Polymers**, v. 238, 2020.
- MOHAMMADI, Aref *et al.* Schizophyllan production by newly isolated fungus *Schizophyllum commune* IBRC-M 30213: optimization of culture medium using response surface methodology. **Annals of Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 47–62, 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.
- MOSCOVICI, Misu. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. **Frontiers Research Foundation**, 2015.
- MOUSAVIASL, Sahar *et al.* Synthesis and characterization of schizophyllan nanogels via inverse emulsion using biobased materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 468–474, 2018.
- MUTHURAMALINGAM, Karthika *et al.* β -Glucan-Based Wet Dressing for Cutaneous Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v. 8, n. 4, p. 125–135, 2019.
- NORISUYE, Takashi; YANAKI, Toshio; FUJITA, Hiroshi. Triple Helix of a *Schizophyllum Commune* Polysaccharide in Aqueous Solution. **Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition**, v. 18, p. 574–558, 1980.

- NOVAK, M.; VETVICKA, V. β -glucans, history, and the present: Immunomodulatory aspects and mechanisms of action. **Journal of Immunotoxicology**, v. 5, n.1, p. 47-57, 2008.
- OKOBIRA, Tadashi *et al.* Molecular dynamics studies of side chain effect on the β -1,3-D-glucan triple helix in aqueous solution. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 3, p. 783–788, 2008.
- PENG, Hailong *et al.* Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 23–28, 2010.
- PHANTHONG, Patchiya *et al.* Nanocellulose: Extraction and application. **Carbon Resources Conversion**, v. 1, p. 32–43, 2018.
- PICHETH, Guilherme Fadel *et al.* Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 97–106, 2017.
- PORTELA, Raquel *et al.* Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. **Microbial Biotechnology**, v. 12, p. 586–610, 2019.
- RAMESH, H. P.; THARANATHAN, R. N. Carbohydrates - The Renewable Raw Materials of High Biotechnological Value. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 149–173, 2003.
- 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.
- RAU, Udo. Glucans secreted by fungi. **Turkish Electronic Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 30–36, 2004.
- RAU, Udo. Production of Schizophyllan. **Methods in Biotechnology**, v. 10, p. 43–55, 1999.
- REDDY, Narendra; REDDY, Roopa; JIANG, Qiuran. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 6, 2015.
- REHM, Bernd H. A. Bacterial polymers: Biosynthesis, modifications and applications. **Nature Reviews Microbiology**, 2010.
- ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 35-58, 1991.
- RUIZ-HERRERA, José. Biosynthesis of β -glucans in fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 60, p. 73-81, 1991.
- RUTHES, A. C.; SMIDERLE, F. R.; IACOMINI, M. Mushroom heteropolysaccharides: A review on their sources, structure and biological effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 358–375, 2016.
- RUTHES, A. C.; SMIDERLE, F. R.; IACOMINI, M. D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 753–761, 2015.
- SAFAEE-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, 2019.

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.

SAKURAGI, Mina *et al.* Entrapment of immature amyloid protofilaments in the hydrophobic domain of schizophyllan. **Polymer Bulletin**, v. 61, n. 1, p. 107–117, 2008.

SASSAKI, Guilherme L. *et al.* Human ($\alpha 2 \rightarrow 6$) and avian ($\alpha 2 \rightarrow 3$) sialylated receptors of influenza A virus show distinct conformations and dynamics in solution. **Biochemistry**, v. 52, n. 41, p. 7217–7230, 2013.

SCHMID, Jochen; MEYER, Vera; SIEBER, Volker. Scleroglucan: Biosynthesis, production and application of a versatile hydrocolloid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 937, p. 937–947, 2011.

SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Factors affecting Production of Cellulose at the Air/ Liquid Interface of a Culture of *Acetobacter xylinum*. **Journal Of General Microbiology**, v. 11, p. 123–129, 1954.

SEO, Gayoung *et al.* The wound healing effect of four types of beta-glucan. **Applied Biological Chemistry**, v. 62, n. 20, 2019.

SHAH, Nasrullah *et al.* Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Carbohydrate POLYMERS**, v. 98, p. 1585–1598, 2013.

SHAO, Wei *et al.* Novel bioactive surface functionalization of bacterial cellulose membrane. **Carbohydrate Polymers**, v. 178, p. 270–276, 2017.

SHI, Lei. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 37–48, 2016.

SHU, Chin Hang; HSU, Hui Ju. Production of schizophyllan glucan by *Schizophyllum commune* ATCC 38548 from detoxified hydrolysate of rice hull. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 3, p. 387–393, 2011.

SINDHU, Rakesh K. *et al.* Immunomodulatory potential of polysaccharides derived from plants and microbes: A narrative review. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, n. 25, 2021.

SMIRNOU, Dzianis *et al.* Ultrasound-assisted production of highly-purified β -glucan schizophyllan and characterization of its immune properties. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 313–319, 2017.

SOUZA, PAULO R. *et al.* Polysaccharide-Based Materials Created by Physical Processes: From Preparation to Biomedical Applications. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, p. 621, 2021.

STUMPF, Taisa R. *et al.* In situ and *ex situ* modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 82, p. 372–383 2018.

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.

SUTHERLAND IW. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends Biotechnology**, v. 16(1), p. 41-46, 1998.

SUTIVISEDSEK, Nongnuch *et al.* Utilization of agricultural biomass in the production of the biopolymer schizophyllan. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 105–112, 2013.

SUTIVISEDSEK, Nongnuch; LEATHERS, Timothy D.; PRICE, Neil PJ. Production of schizophyllan from distiller's dried grains with solubles by diverse strains of *Schizophyllum commune*. **SpringerPlus**, v. 2, n. 476, p. 1–6, 2013.

SYNYTSYA, Andriy; NOVAK, Miroslav. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 792-809, 2013.

SYNYTSYA, Andriy; NOVAK, Miroslav. Structural analysis of glucans. **Annals of Translational Medicine**, v. 2, n. 2, 2014.

TEIXEIRA, Marta A. *et al.* Electrospun nanocomposites containing cellulose and its derivatives modified with specialized biomolecules for an enhanced wound healing. **Nanomaterials**, v. 10, n. 557, 2020.

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.

TZIANABOS, Arthur O. Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biologic Function. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 523–533, 2000.

UL-ISLAM, Mazhar *et al.* Effect of chitosan penetration on physico-chemical and mechanical properties of bacterial cellulose. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 8, p. 1736–1743, 2011.

UL-ISLAM, Mazhar *et al.* Ex situ Synthesis and Characterization of High Strength Multipurpose Bacterial Cellulose-Aloe vera Hydrogels. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 2021.

UL-ISLAM, Mazhar; KHAN, Taous; PARK, Joong Kon. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 596–603, 2012.

VANIN, Ana Paula *et al.* β -(1→3)(1→6) glucan from *Schizophyllum commune* 227E.32: High yield production via glucose/xylose co-metabolization. **Carbohydrate Polymers**, v. 320, n.15, 121176, 2023.

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.

VETVICKA, Vaclav. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 2, n. 2, p. 115, 2011.

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.

WANG, Qiang *et al.* β -Glucans: Relationships between modification, conformation and functional activities. **Molecules**, v. 22, n. 257, 2017.

WILKINSON, J F. The extracellular polysaccharides of bacteria. **Extracellular bacterial polysaccharides**, v. 22, 1958.

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.

XU, Shuqin; XU, Xiaojuan; ZHANG, Lina. Branching structure and chain conformation of water-soluble glucan extracted from *Auricularia auricula-judae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 13, p. 3498–3506, 2012.

YANAKI, Toshio *et al.* Correlation between the antitumor activity of a polysaccharide schizophyllan and its triple-helical conformation in dilute aqueous solution. **Biophysical Chemistry**, v. 17, p. 337–342, 1983.

YANAKI, Toshio; TABATA, Kengo; KOJIMA, Takemasa. Melting Behaviour of a Triple Helical Polysaccharide Schizophyllan in Aqueous Solution. **Carbohydrate Polymers**. 1985.

YANG, Yongyan *et al.* Recent advances in polysaccharide-based self-healing hydrogels for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 283, 2022.

YANG, Liquan; ZHANG, Li Ming. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 349–361, 2009.

ZHANG, Hongbin *et al.* A molecular description of the gelation mechanism of curdlan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 30, p. 7–16, 2002.

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.

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.

ZHENG, Lu *et al.* Latest Advances on Bacterial Cellulose-Based Antibacterial Materials as Wound Dressings. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020.

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

ZHONG, Kui *et al.* Rheological properties and antitumor activity of schizophyllan produced with solid-state fermentation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 13–17, 2013.

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.

Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo a Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) a disponibilizar em ambiente digital institucional, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/IBICT) e/ou outras bases de dados científicas, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o texto integral da obra abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data __/__/____.

1. Identificação do material bibliográfico: (x) Tese () Dissertação () Trabalho de Conclusão

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Autor: Ketlin Cristine Batista Mancinelli

Orientador: Gilmar S. Erzinger

Coorientador: Ana Paula T. Pezzin

Data de Defesa: 23/06/2023

Título: Desenvolvimento de um biomaterial composto de celulose bacteriana e polissacarídeo fúngico.

Instituição de Defesa: Universidade da Região de Joinville - Univille

3. Informação de acesso ao documento:

Pode ser liberado para publicação integral () Sim (x) Não

Havendo concordância com a publicação eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese, dissertação ou relatório técnico.



Assinatura do autor



Local/Data