

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Modificação a Plasma de Compósitos a Base de
Celulose Bacteriana e Fosfato de Prata**

Amanda Lyane Generoso *

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para a
obtenção do título de
MESTRA em QUÍMICA, área
de concentração: QUÍMICA

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Andrea Cruz

*** Bolsista CAPES**

SÃO CARLOS
2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Amanda Lyane Generoso, realizada em 29/02/2024.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Sandra Andrea Cruz (UFSCar)

Profa. Dra. Suzana Mali de Oliveira (UEL)

Prof. Dr. Cauê Ribeiro de Oliveira (EMBRAPA)

"Na vida, não existe nada a temer, mas a entender. Agora é a hora de entender mais, para temer menos."
— Marie Curie

DEDICATÓRIA

A Deus e a espiritualidade pela inspiração;

A minha querida mãe Eliana, por todo amor e carinho. Sua força e dedicação me incentivam diariamente a atingir meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

- A minha mãe por todo encorajamento, companheirismo e pelo amor incondicional;
- A minha irmã Fernanda, por sempre esclarecer as minhas dúvidas, pelo incentivo e por toda ajuda sem exceção;
- Ao meu namorado Nando, pelo apoio infinito, pelo carinho, pelas críticas construtivas e, principalmente, por me fazer acreditar que tudo daria certo;
- A Jackie, Mel, Teodora, Noah, Betina e Olívia por estarem sempre ao meu lado nos momentos de estudo em casa;
- Ao meu grupo de pesquisa: Isabelly, Robert, Larissa, Jéssica, Maria Antônia, Naiton, Grazi, Maciel, Sophia e Jéssica Fernanda. Agradeço por ter sido absolutamente bem recebida. Gratidão a todos pelo companheirismo, pela paciência, pelas risadas, pelos ensinamentos valiosos e por toda a ajuda que recebi durante esses dois anos;
- A empresa HB Biotech, por me disponibilizar a celulose bacteriana.
- A UNIARA, em especial a Dra. Lais, pelas análises de TGA e por todas as contribuições no desenvolvimento desse trabalho e a Dra. Marina pelo ensaio de Viabilidade Celular;
- Ao Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da UFSCar, em especial ao Marcos, pela análise de FTIR-ATR;
- A Embrapa, pela análise de DRX;
- Ao LNNano/CNPEM pela análise de AFM;
- Ao LPBM da Unesp, pelo ensaio antimicrobiano;
- Em especial à minha orientadora, professora Dra. Sandra Cruz pela dedicação, paciência, pelo imenso aprendizado e por todo o suporte nesta trajetória. Muito obrigada!
- Finalmente, agradeço a UFSCar, em especial ao Programa de Pós-graduação em Química, pela oportunidade de avançar em meus estudos.
- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 2.1 – (a) Película de celulose bacteriana em meio de cultura, obtida por meio do cultivo, realizado em modo estático, da cepa AF1 da bactéria *Komagataeibacter xylinus* e (b) Celulose bacteriana purificada. Fonte: Autora.....6
- FIGURA 2.2 - Representação da celobiose, unidade de repetição da celulose bacteriana. Fonte: Elaborado pela autora7
- FIGURA 2.3 - Representação estrutural de celulose bacteriana demonstrando suas ligações de hidrogênio, inter e intramoleculares. Fonte: Adaptado ¹²8
- FIGURA 2.4 - Micrografias de Ag_3PO_4 , nas morfologias (a) esféricas e (b) cúbicas. Fonte: Adaptado ⁵⁵14
- FIGURA 4.1 - Esquema ilustrativo do processo de síntese dos filmes compósitos de celulose bacteriana e fosfato de prata (CB/ Ag_3PO_4). Fonte: Elaborado pela autora através do site BioRender.com.....25
- Figura 4.2 - Esquema ilustrativo da exposição por plasma de oxigênio nos filmes de CB. Fonte: Elaborado pela autora.....31
- FIGURA 5.1 – Desenho esquemático da possível reação entre a celulose bacteriana e o fosfato dissódico.....36
- FIGURA 5.2 – Desenho esquemático da reação entre a celulose bacteriana concentrada com íons fosfato e o nitrato de prata.....38

FIGURA 5.3 - Espectros de absorção de FTIR das amostras de celulose bacteriana pura e dos filmes compósitos de CB/Ag ₃ PO ₄ na região de 4.000 a 500 cm ⁻¹	38
FIGURA 5.4 - Espectros de absorção de FTIR das amostras de celulose bacteriana pura e dos filmes compósitos de CB/Ag ₃ PO ₄ na região de 4000 a 1500 cm ⁻¹	39
FIGURA 5.5 - Espectros de absorção na região de 1.500 a 500 cm ⁻¹ , da celulose bacteriana pura e dos filmes compósitos de CB/Ag ₃ PO ₄	40
FIGURA 5.6 - Espectros de absorção na região de 4.000 a 500 cm ⁻¹ , correspondentes a CB Pura, ao resíduo de FTIR e as partículas de Ag ₃ PO ₄	42
FIGURA 5.7 - Micrografias da superfície (a) e da seção transversal (b) dos filmes de celulose bacteriana pura	43
FIGURA 5.8 - Micrografias dos compósitos de CB/Ag ₃ PO ₄ obtidas em diferentes ampliações (2000x e 8000x).....	44
FIGURA 5.9 – Mapeamento por MEV-EDS dos compósitos (A) 0,0001_CB/Ag ₃ PO ₄ , (D) 0,0005_CB/Ag ₃ PO ₄ e (G) 0,001_CB/Ag ₃ PO ₄ , (B), (E), (H): indicando a presença do elemento prata (Ag) e (C), (F), (I): indicando a presença do elemento fósforo (P).....	45-46
FIGURA 5.10 - Micrografias da seção transversal dos compósitos 0,0001_CB/Ag ₃ PO ₄ , 0,0005_CB/Ag ₃ PO ₄ e 0,001_CB/Ag ₃ PO ₄	46

FIGURA 5.11. Micrografia da superfície do compósito 0,001_CB/Ag ₃ PO ₄	47
FIGURA 5.12 - Difratoogramas de raios X dos filmes de celulose bacteriana pura (CB pura) e dos filmes compósitos (CB/Ag ₃ PO ₄)	49
FIGURA 5.13 - Difratoograma do Ag ₃ PO ₄ e seus respectivos planos cristalográficos. Fonte: Adaptado ⁴⁶	51
Figura 5.14 - Curvas DSC dos filmes de celulose bacteriana pura e dos filmes compósitos de CB/Ag ₃ PO ₄	52
Figura 5.15 - Curvas de TG (a) e DTG (b) obtidas dos filmes de celulose bacteriana e dos compósitos de CB/Ag ₃ PO ₄	54
FIGURA 5.16 - Representação da medida de ângulo de contato (θ) entre uma superfície sólida e um líquido. Fonte: Autora.....	57
FIGURA 5.17 - Resultados das medidas de ângulo de contato, suas respectivas representações em diferentes líquidos (a: água – H ₂ O e, b: diiodometano – CH ₂ I ₂) e os valores de ângulo de contato obtidos referentes a CB pura e aos compósitos de CB/Ag ₃ PO ₄	59
FIGURA 5.18 – Representação gráfica da (a)Tensão Superficial e suas (b) Componentes Polar e Dispersiva.....	63
Figura 5.19 - Viabilidade Celular dos filmes de CB e dos filmes de CB/Ag ₃ PO ₄	64
FIGURA 5.20 - Micrografias de AFM das amostras de CB pura antes (a) e após (b) o tratamento a plasma; dos compósitos (c) 0,0001_CB/Ag ₃ PO ₄ e (d) 0,001_CB/Ag ₃ PO ₄ (d) antes e após o tratamento a plasma (e) 1P-2,5 min (f) 2P-2,5 min.....	66-67

FIGURA 5.21 – Micrografias em 2 D de AFM das amostras de CB pura antes (a) e após (b) o tratamento a plasma; dos compósitos (c) 0,0001_CB/Ag₃PO₄ e (d) 0,001_CB/Ag₃PO₄ (d) antes e após o tratamento a plasma (e) 1P-2,5 min (f) 2P-2,5 min.....68-69

FIGURA 5.22 – Espectros normalizados de FTIR-ATR para as amostras dos filmes de (a) CB pura antes e após o tratamento por plasma de oxigênio: (b) CBP-2,5 min e (c) CBP-5 min.....69

FIGURA 5.23 – Espectros normalizados de FTIR-ATR para as amostras do filme de CB Pura (a) e do compósito de 0,0001_CB/Ag₃PO₄ antes (b) e após o tratamento por plasma de oxigênio 1P - 2,5 min(c) e 1P - 5 min (d).....71

FIGURA 5.24 – Espectros normalizados de FTIR-ATR para as amostras do filme de CB Pura (a) e do compósito de 0,001_CB/Ag₃PO₄ antes (b) e após o tratamento por plasma de oxigênio 2P – 2,5 min(c) e 2P - 5 min (d)71-72

FIGURA 5.25 Representação do ângulo de contato obtido em : diiodometano correspondentes a amostra de celulose bacteriana pura CBP -2,5 min , e aos compósitos 1P – 2,5 min e 2P – 2,5 min.....72

FIGURA 5.26 - Resultados do ensaio antimicrobiano de difusão em ágar da celulose bacteriana e dos compósitos de CB/Ag₃PO₄, sem o tratamento a plasma, contra as bactérias gram-positiva e gram-negativa, e o fungo patogênico.....74

FIGURA 5.27 - Resultados do ensaio antimicrobiano de difusão em ágar da celulose bacteriana e dos compósitos de CB/Ag₃PO₄, após o tratamento a plasma, contra as bactérias gram-positiva e gram-negativa, e o fungo patogênico.....77

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 Reagentes utilizados na Síntese do Ag_3PO_4	21
TABELA 4.2 – Nomenclatura das amostras submetidas ao tratamento a Plasma de oxigênio	32
TABELA 5.1 – Picos de difração correspondentes a CB pura e aos compósitos de $\text{CB}/\text{Ag}_3\text{PO}_4$	48
TABELA 5.2 - Filmes de celulose bacteriana pura e dos compósitos de $\text{CB}/\text{Ag}_3\text{PO}_4$ com seus respectivos índices de cristalinidade	50
TABELA 5.3 – Valores correspondentes a temperatura de fusão (T_m) da CB pura e dos compósitos de $\text{CB}/\text{Ag}_3\text{PO}_4$	53
TABELA 5.4 – Dados obtidos por meio das curvas de TG e DTG	56
TABELA 5.5. Medidas de ângulo de contato da CB pura e dos compósitos de $\text{CB}/\text{Ag}_3\text{PO}_4$	60
TABELA 5.6 - Valores tabelados correspondentes a tensão superficial e as componentes dispersivas e polares da água e do diiodometano	62
TABELA 5.7 Medidas do halo de inibição (em mm), correspondentes a CB pura e dos compósitos de $\text{CB}/\text{Ag}_3\text{PO}_4$	75
TABELA 5.8 - Medidas do halo de inibição (em mm), correspondentes a CB pura e aos compósitos de $\text{CB}/\text{Ag}_3\text{PO}_4$ após o tratamento a plasma	77

RESUMO

MODIFICAÇÃO A PLASMA DE COMPÓSITOS A BASE DE CELULOSE BACTERIANA E FOSFATO DE PRATA

A pandemia de coronavírus (COVID-19) evidenciou a problemática das infecções microbianas emergentes na saúde pública da atualidade, as quais demonstram-se, muitas vezes, difíceis ou até mesmo impossíveis de serem tratadas. Nesse contexto, visando a proteção da população humana, é impulsionada a demanda pelo desenvolvimento de materiais híbridos avançados e novas tecnologias que inativem microrganismos. A celulose bacteriana (CB) é um polímero natural, que apresenta elevada resistência mecânica, alta capacidade de retenção de água, elevada cristalinidade e estabilidade térmica. Possui ainda vantagens de ser biocompatível, atóxica e biodegradável. Sua estrutura altamente porosa é constituída por nanofibras que favorecem a modificação e incorporação de substâncias em sua matriz para melhorar ou agregar propriedades. Apesar de suas excelentes características, a CB em sua forma natural, não apresenta atividade antimicrobiana, portanto, muitos cientistas têm se dedicado à pesquisa de métodos para acrescentar esta propriedade e ampliar a aplicabilidade desse biopolímero. Estudos recentes demonstram que materiais semicondutores, como o fosfato de prata (Ag_3PO_4), apresentam elevado potencial biocida contra bactérias, fungos e vírus. Neste sentido, este trabalho propôs sintetizar filmes compósitos de CB/ Ag_3PO_4 empregando-se um sistema de filtração a vácuo para a formação e imobilização dos cristais de Ag_3PO_4 na matriz de CB, desenvolvendo um material com melhores propriedades físico-químicas, biocompatível, atóxico com atividade antimicrobiana. Adicionalmente foi realizada a modificação dos filmes compósitos pelo plasma *etching* de oxigênio (O_2), para promover a exposição das micropartículas de Ag_3PO_4 incorporadas ao biopolímero, intensificando o efeito antimicrobiano do material. As micrografias dos compósitos de CB/ Ag_3PO_4 obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), confirmaram a presença de micropartículas dispersas e aglomerados distribuídos por toda a extensão da matriz polimérica. Foi observado que os compósitos de CB/ Ag_3PO_4 apresentaram um aumento de sua estabilidade térmica, em comparação com os filmes de CB pura. Além disso, foi realizado um ensaio de citotoxicidade celular, que atestou uma viabilidade celular acima de 70% para os filmes de CB pura e para os compósitos CB/ Ag_3PO_4 . Após o tratamento a plasma de oxigênio, os resultados indicaram um aumento na hidrofiliabilidade dos filmes de CB pura e dos compósitos de CB/ Ag_3PO_4 devido a incorporação de grupos funcionais oxigenados no material.

Palavras-chave: Compósito, celulose bacteriana, micropartículas de prata, efeito antimicrobiano, plasma de oxigênio.

ABSTRACT

PLASMA MODIFICATION OF COMPOSITES BASED ON BACTERIAL CELLULOSE AND SILVER PHOSPHATE

The recent of coronavirus pandemic (COVID-19) highlighted the problem of emerging microbial infections in the current public health scenario, which are often difficult or even impossible to treat. In this context, there is a demand for the development of advanced materials that inactivate microorganisms aiming at the protection of the human population. Bacterial Cellulose (BC) is a natural polymer, which has high mechanical resistance, high water retention capacity, high crystallinity, and thermal stability. It also has the advantages of being biocompatible, non-toxic, and biodegradable. The architecture of the BC is composed of nanofibers with high porosity, which contribute to modifications and incorporation of substances in its matrix to improve or add properties and expanding its applicability. Despite its excellent characteristics, BC in its natural form does not present antimicrobial activity, therefore, many scientists have dedicated themselves to researching methods to add this property and expand the applicability of this biopolymer. Recent studies demonstrate that semiconductor materials, such as silver phosphate (Ag_3PO_4), have high biocidal potential against bacteria, fungi, and viruses. In that regard, this work proposed to synthesize BC/ Ag_3PO_4 composite films using a vacuum filtration system for the formation and immobilization of Ag_3PO_4 crystals in the BC matrix, developing a material with better physicochemical properties, biocompatible, non-toxic and with antimicrobial properties. Additionally, the composite films were modified by oxygen plasma etching, to promote the exposure of Ag_3PO_4 microparticles incorporated into the biopolymer, intensifying the material's antimicrobial effect. The micrographs of the BC/ Ag_3PO_4 composites obtained by SEM confirmed the presence of dispersed microparticles and agglomerates distributed throughout the entire length of the polymeric matrix. Furthermore, a cell cytotoxicity assay was carried out, which attested to cell viability above 70% for pure BC films as well as for BC/ Ag_3PO_4 composites. Analyses carried out after oxygen plasma treatment indicate an increase in the hydrophilicity of pure BC films and BC/ Ag_3PO_4 composites due to the incorporation of oxygenated functional groups in the material.

Keywords: Composite, bacterial cellulose, silver microparticles, antimicrobial effect, plasma oxygen.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1) Polímeros Naturais: Celulose Bacteriana.....	5
2.2) Fosfato de Prata.....	11
2.3) Plasma.....	15
2.3.1) Tratamento a Plasma <i>Etching</i> de Oxigênio.....	18
3. Objetivos	20
3.1) Objetivos Gerais.....	20
3.2) Objetivos Específicos.....	20
4. Materiais e Métodos	21
4.1) Materiais e Reagentes.....	21
4.2) Metodologia.....	21
4.3) Espectroscopia de Transmitância na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier por Refletância Atenuada (FTIR-ATR).....	25
4.4) Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV-EDS).....	25
4.5) Difração de raios X (DRX).....	26
4.6) Análise Termogravimétrica (TGA).....	27
4.7) Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	27
4.8) Ângulo de Contato (θ).....	28
4.9) Ensaio de Citotoxicidade Celular.....	29
4.10) Análise Estatística.....	30
4.11) Espectroscopia de Transmitância na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier por Refletância Atenuada (FTIR-ATR).....	33
4.12) Ângulo de Contato (θ).....	33
4.13) Microscopia de Força Atômica (AFM).....	33
4.14) Ensaio de Atividade Antimicrobiana.....	34
5. Resultados e Discussões	35
5.1) Avaliação da Influência das Partículas de Ag_3PO_4 nos Filmes de Celulose Bacteriana.....	35
5.3) Análises Térmicas.....	51
5.4) Ângulo de Contato (θ).....	57
5.5) Avaliação da Citotoxicidade Celular.....	63
5.6) Avaliação dos Filmes Compósitos de CB/ Ag_3PO_4 após o Tratamento a Plasma.....	64
5.6) Ensaio Antimicrobiano.....	74
6. Considerações Finais	78
7. Referências Bibliográficas	81

1. Introdução

A pandemia desencadeada pelo novo coronavírus SARS-CoV-2, agente da COVID-19, decretada oficialmente pela OMS (Organização Mundial da Saúde) em março de 2020, evidenciou a fragilidade do sistema de saúde no combate a infecções microbianas emergentes, que configuram um dos principais desafios da atualidade, conduzindo a população mundial a buscar soluções inovadoras, impulsionando o desenvolvimento de materiais multifuncionais e novas tecnologias que reduzam a disseminação e inativem microrganismos, diminuindo a incidência de suas patologias ⁽¹⁻³⁾.

O desenvolvimento de sistemas compósitos a partir da combinação de componentes orgânicos e inorgânicos, permite a criação de materiais híbridos multifuncionais. O desafio consiste em estabelecer uma combinação sinérgica das propriedades individuais dos materiais, tais como, a estabilidade térmica e química, dos materiais inorgânicos com a flexibilidade e a processabilidade, dos polímeros orgânicos. A versatilidade desses materiais possibilita, por exemplo, a confecção de materiais híbridos antimicrobianos, como os nanocompósitos poliméricos, que possibilitam uma vasta gama de aplicações, tais como revestimentos de implantes, curativos para feridas, embalagens ativas antimicrobianas etc ^(4,5).

Descoberta por Brown há mais de 130 anos, a celulose bacteriana (CB) é um polissacarídeo, obtido por meio de um processo de fermentação realizado por algumas bactérias, como as do gênero *Komagataeibacter* e, diferentemente da celulose extraída de plantas, apresenta natureza quimicamente pura, pois sua composição é livre de lignina, hemicelulose e outros componentes derivados da parede celular vegetal ⁽⁶⁻⁹⁾. Esse polímero natural, é constituído por cadeias lineares formadas por monômeros de glicose, unidos entre si por meio de ligações glicosídicas $\beta - (1,4)$ ⁽³⁻⁶⁾.

Composta por fibrilas nanométricas repleta por grupos hidroxila, a CB é mantida por ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares ao longo de sua estrutura, responsáveis pela sua elevada cristalinidade. Além disso, sua grande capacidade de absorção de água, associada à sua elevada porosidade intrínseca, favorece a permeação de líquidos e seu processo de biodegradação ⁸. Essas características garantem a celulose bacteriana excelentes propriedades, como alta resistência à tração, elasticidade e elevada capacidade de retenção de água. Além de ser biodegradável, atóxica e biocompatível ⁽⁹⁻¹²⁾.

A CB é um material promissor, com elevado potencial em aplicações industriais, entretanto sua produção envolve um elevado custo comercial, restringindo sua comercialização a nichos de alto valor, tendo seu uso mais evidenciado na área biomédica, com aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) para utilização em curativos, distribuição de medicamentos, reparação da cartilagem ^(9,13-15). Sua estrutura altamente porosa é formada por nanofibras que contribuem para modificações e incorporação de substâncias em sua matriz para melhorar ou agregar propriedades possibilitando a obtenção de estruturas com propriedades superiores ampliando ainda mais sua gama aplicações ^(9,12). Apesar de não apresentar atividade antimicrobiana, essa limitação pode ser contornada através da incorporação de agentes antimicrobianos à matriz polimérica de CB, tais como partículas de prata, possibilitando o desenvolvimento de materiais compósitos com potencial biocida ^(16,17).

Recentes avanços demonstraram o desenvolvimento de excelentes materiais antissépticos constituídos por óxidos de prata como três polimorfos de Ag_2WO_4 , $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ e Ag_3PO_4 , que atuam sem a ação da prata metálica, reduzindo a probabilidade de o corpo humano apresentar uma resposta citotóxica ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. O fosfato de prata (Ag_3PO_4) é um material semiconductor

promissor devido a sua elevada eficiência fotocatalítica na luz visível¹⁸. No entanto, sua baixa estabilidade ocasionada pela fotocorrosão e rápida combinação dos pares elétron(e^-)/buraco (h^+), pode ser contornada através de sua imobilização, em plataformas adequadas, para a exploração de todo seu potencial. Ademais, esse material possui atividade antimicrobiana, antifúngica e antiviral. A presença do grupo fosfato em sua estrutura, pode promover um aumento de sua biocompatibilidade, que aliada à sua baixa toxicidade, tornam esse composto um excelente candidato para aplicações como agente antisséptico em embalagens ativas antimicrobianas e curativos prevenindo contaminações por patógenos^(18,23).

A tecnologia de plasma vem sendo amplamente empregada em laboratórios de pesquisa e indústrias de alta tecnologia, pois ela promove um aumento significativo na eficiência de processos químicos convencionais de modificação de superfícies^(25-27,29). O tratamento de materiais poliméricos pelo plasma *etching* pode promover tanto uma alteração química de superfície, ocasionada pela inserção de grupos funcionais gerados pelo gás utilizado, quanto morfológica, devido ao bombardeamento de íons, elétrons e espécies quimicamente energéticas, que promovem uma “corrosão” na superfície do material, sem que ocorra uma alteração de suas propriedades *bulk*^(14-15, 24). Além disso, essa modificação superficial pode proporcionar uma exposição das partículas incorporadas ao material polimérico, permitindo uma maior interação entre o agente antisséptico e o microrganismo patógeno, ocasionando uma intensificação no efeito antimicrobiano do material²⁵. Ademais, as modificações resultantes da exposição ao plasma *etching* nas propriedades intrínsecas do biopolímero, tais como, sua nanorugosidade e a molhabilidade, podem contribuir para o aumento da biocompatibilidade dos compósitos e ampliar ainda mais a sua aplicabilidade no setor biomédico^(14-15, 26).

Nesse contexto, foi proposta uma metodologia onde utiliza-se um funil de Buchner de placa porosa na etapa de incorporação das partículas de fosfato de prata à matriz polimérica, para direcionar a formação desses cristais na superfície dos filmes de celulose bacteriana, garantindo a confecção de um material atóxico, com elevada biocompatibilidade e potencial atividade antimicrobiana para aplicação no setor biomédico. A influência da incorporação de diferentes concentrações de Ag_3PO_4 , nas propriedades do biopolímero, foi investigada a partir de técnicas espectroscópicas, térmicas e morfológicas. Foi avaliada também, a viabilidade celular dos filmes compósitos, segundo a ISO 10993-12. As modificações químicas superficiais foram analisadas por meio das técnicas de espectroscopia de transmitância na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR) e ângulo de contato (θ). As alterações topográficas foram analisadas por microscopia de força atômica (AFM). Finalmente, o efeito antimicrobiano dos filmes compósitos foi avaliado por meio da análise da atividade biológica dos materiais, empregando a técnica de difusão em ágar, seguindo as normas do CLSI M2-A8, com espécies patogênicas de uma bactéria gram-positiva, gram-negativa e uma espécie de fungo.

2. Revisão Bibliográfica

2.1) Polímeros Naturais: Celulose Bacteriana

Os polímeros naturais são materiais oriundos essencialmente de fontes naturais e renováveis, podendo ser provenientes de recursos sustentáveis, tais como, amido, celulose, quitina, quitosana, alginato etc. Esses materiais são formados a partir de monômeros que se unem por meio de ligações covalentes e formam moléculas maiores ⁽³⁰⁻³²⁾. A celulose é o biopolímero mais abundante da face terrestre, exercendo um papel fundamental no setor industrial devido a sua versatilidade como fonte de diversas aplicações industriais.

Desde o século XVIII, a celulose bacteriana era consumida como uma sobremesa Filipina, a “nata de coco”, obtida a partir de um processo fermentativo realizado por bactérias. Em 1886, Brown ⁶ relatou a obtenção de celulose bacteriana por meio de um processo de fermentação acética (FIGURA 2.1) realizado pela bactéria gram-negativa *Acetobacter xylinum* (atualmente reclassificada como *Gluconacetobacter xylinum*). Desde então, diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para compreender seu processo de produção, a partir da adequação de seus parâmetros de síntese que incluem a escolha de meios de cultura, processo de incubação, modo de cultivo e purificação, buscando otimizar a obtenção desse material ^(9,33,34,36).

O meio de cultura padrão constituído por glicose, peptona e extrato de levedura, como fontes de carbono e nitrogênio, mais comum e amplamente empregado para a síntese de CB, conhecido como HS, foi desenvolvido por Hestrin e Schramm (1954), em seus estudos com a bactéria *A. xylinum*³³. Em sua pesquisa, foi estabelecido que a formação da película de celulose ocorre devido ao crescimento das bactérias que resulta num aumento da concentração de células na superfície do meio de cultura, onde ocorre a maior produção de celulose, devido a presença de oxigênio. A formação da película de celulose na interface ar/líquido (FIGURA 2.1 - a) permite que o microrganismo tenha mais acesso ao oxigênio, essencial para o seu desenvolvimento (11,33-36). Além de ser um mecanismo de autodefesa da bactéria, que contribui para evitar a desidratação do substrato devido ao seu caráter higroscópico e é capaz de protegê-la contra a radiação ultravioleta (12,34).

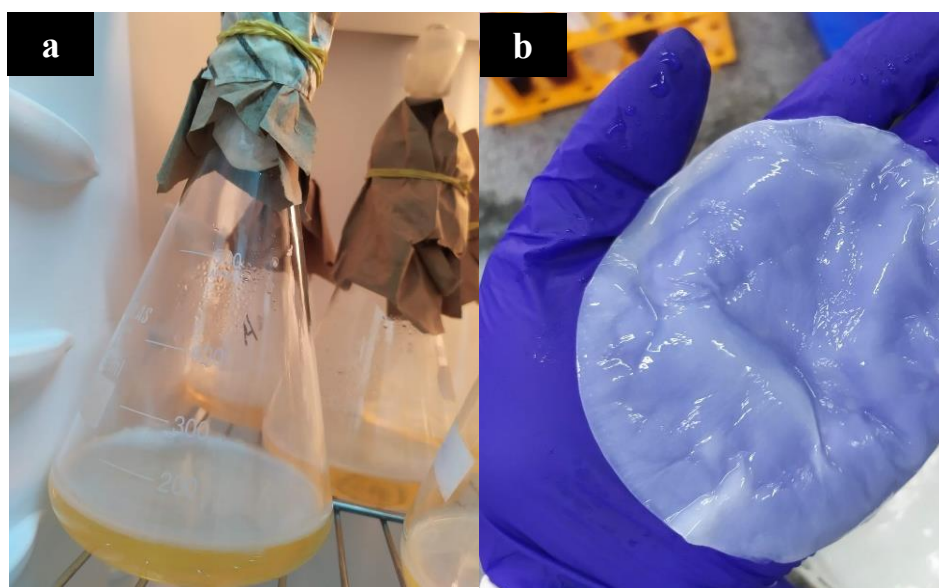


FIGURA 2.1 - (a) Película de celulose bacteriana em meio de cultura, obtida por meio do cultivo, realizado em modo estático, da cepa AF1 da bactéria *Komagataeibacter xylinus* e (b) Celulose bacteriana purificada. Fonte: Autora.

Diferentemente da celulose obtida por meio de plantas (celulose vegetal - CV), a celulose bacteriana (CB) é considerada quimicamente pura, pois sua estrutura é livre de lignina, hemicelulose e outros componentes orgânicos provenientes da parede celular vegetal, proporcionando um processo de purificação mais simples que o da CV. Ambas as celuloses (bacteriana e vegetal) apresentam a mesma estrutura molecular, com fórmula química $(C_6H_{10}O_5)_n$. A CB é constituída por cadeias lineares formadas por monômeros de glicose (unidades β -D-glucopiranoose), unidos entre si por meio de ligações glicosídicas β - (1,4) (FIGURA 2.2) ⁵⁻⁹.

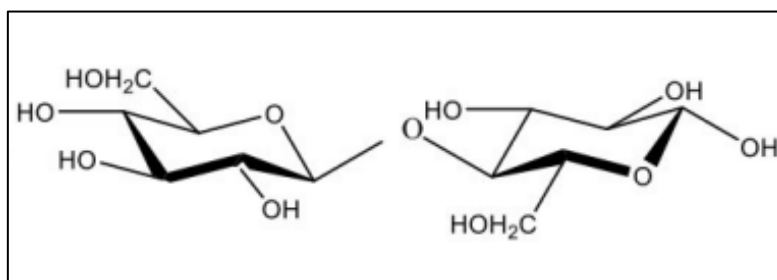


FIGURA 2.2 – Unidade estrutural de repetição da celulose bacteriana, β -D-glucopiranoose, unidas pela ligação glicosídica β - (1,4). Fonte: Elaborado pela autora.

Suas fibrilas nanométricas, com diâmetros entre 20 e 100 nm, repletas por grupos hidroxila, são mantidas entre si por ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares ao longo de sua estrutura (FIGURA 2.3) ³⁷. Sendo, as interações intermoleculares responsáveis pela formação de suas fibras e as interações intramoleculares pela rigidez de sua cadeia polimérica, associadas à sua elevada cristalinidade e resistência mecânica ^(12-11,33-34).

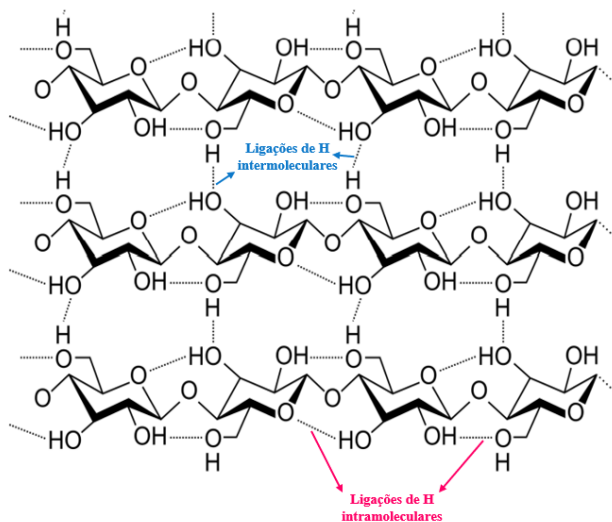


FIGURA 2.3 - Representação estrutural de celulose bacteriana demonstrando suas ligações de hidrogênio, inter e intramoleculares. Fonte: Adaptado ¹².

A estrutura altamente porosa associada a extensa área superficial da CB, influenciam nas suas propriedades únicas, como a sua elevada capacidade de retenção de água e alta cristalinidade, que são responsáveis pela estabilidade térmica deste biopolímero, característica que permite sua esterilização por meio de tratamentos térmicos, como o processo de autoclavagem ³⁸. Outras características da CB incluem sua notável flexibilidade e elevada resistência mecânica, comparando-a com o polipropileno, um polímero sintético, que possui resistência a tração na faixa de 20 a 45 MPa e módulo de Young na faixa de 1,0-1,5 GPa, a CB possui um módulo de Young e resistência a tração superiores, de 15-35 GPa e 200-300 Mpa, respectivamente. Além disso, a CB também possui as vantagens de ser biodegradável, atóxica e biocompatível ⁵. Essas características estimulam a aplicação desse biopolímero em diversas áreas, tais como no setor biomédico atuando na engenharia de tecidos, distribuição de fármacos e na fabricação de cosméticos; alimentícia como embalagens, no controle de qualidade de alimentos; dispositivos eletrônicos, na fabricação de sensores, monitoramento ambiental etc ^(9,38,39).

As microfibrilas, que constituem as fibras de CB são compostas por regiões cristalinas, que possuem um elevado grau de organização e, também,

por regiões desordenadas (amorfas), consequência de alterações no processo de cristalização de suas moléculas. A forma cristalina de celulose nativa, é a celulose I, que possui dois alomorfos com diferentes padrões de ligação de hidrogênio, a celulose I α e a celulose I β . A estrutura triclínica é correspondente a celulose I α e possui apenas uma cadeia por célula unitária. Essa é a estrutura predominante na celulose bacteriana. O alomorfo I β , é constituído por duas cadeias de celulose por célula unitária, correspondente a estrutura cristalina monoclínica. Formada a partir de um tratamento da celulose I com hidróxido de sódio (NaOH), a celulose II é o polimorfo mais estável, sendo uma das mais estudadas ⁽⁴⁰⁻⁴²⁾.

Outros polimorfos de celulose, incluem as celuloses III₁, III₂ e IV, que se diferenciam pela orientação de suas fibras, podem ser obtidas quando a celulose I e II são submetidas a tratamentos químicos e/ou térmicos ^(41,42). O método usual de produção da celulose bacteriana emprega o substrato Hestrin e Schramm (HS), que é constituído pela glicose, responsável pela fonte de carbono, peptona e extrato de levedura como fontes de nitrogênio, fosfato dissódico e ácido cítrico. A utilização dessas substâncias como substrato para a produção de CB inviabiliza economicamente o emprego desse material em escala industrial, devido ao seu alto valor agregado, pois o meio de cultura corresponde a aproximadamente 30% dos custos empregados em sua produção. Ao longo dos anos, componentes alternativos de matéria-prima, para a produção desse biopolímero, vem sendo estudados para expandir a utilização desse material e reduzir seus custos de produção. Uma alternativa interessante e sustentável, consiste no emprego de resíduos têxteis à base de algodão, resíduos agroindustriais e provenientes do processamento de alimentos, como substrato para a obtenção de celulose bacteriana, devido ao elevado teor de glicose e frutose ³⁹. Substratos agrícolas obtidos a partir do soro de soja foram otimizados para a produção

de CB, por SUWANPOSRI et al. (2014) e REVIN et al. (2018) Neste estudo foi demonstrado que vinhaça fina de trigo e soro de leite, subprodutos ácidos da indústria de álcool e de laticínios, consistem em um meio de cultura promissor para a produção de celulose bacteriana ^(43,44). SOUZA et al. (2020), em seu estudo recente, utilizou suco de caju como fonte de carbono e melado de soja como fonte de nitrogênio para a produção de membranas de celulose bacteriana a partir da bactéria *Acetobacter xylinus* (ATCC 53582) ⁴⁵. As membranas produzidas por meio deste meio de cultura alternativo apresentaram características semelhantes às membranas obtidas através do substrato padrão, porém com maior rendimento e custo inferior ⁴⁵.

Na indústria biomédica é crescente o número de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de materiais constituídos por uma base biológica, como a CB, aplicações na cicatrização de feridas, dispositivos médicos para a entrega de fármacos, implantes etc. ¹⁰³. Dessa maneira, aumenta a demanda por estudos para a compreensão e para o aprimoramento desses materiais voltados para aplicações biomédicas. Pesquisas voltadas para a incorporação de agentes antimicrobianos na CB aprimoram suas qualidades e impulsionam as suas aplicações no setor biomédico como materiais antissépticos. NAKYAMA et al. (2016) desenvolveram compósitos de CB e gelatina que apresentaram propriedades mecânicas melhoradas ⁴⁷. LIN et al. (2013) avaliaram a eficácia de compósitos de CB e quitosana na cicatrização de feridas e, foi concluído, que o material obtido promoveu uma regeneração tecidual mais rápida, que os curativos convencionais e os curativos de celulose bacteriana, além disso o material não apresentou qualquer efeito citotóxico para a célula de mamíferos ⁴⁸. JENKHONGKARN e PHISALAPHONG (2023) estudaram o efeito de diferentes reduções químicas na síntese de compósitos de CB/Ag com múltiplas propriedades, além de um potencial antimicrobiano comprovado para todas as amostras ³⁷.

Compósitos antimicrobianos para revestimento de frutas (testados com laranjas e maçãs), constituídos de celulose bacteriana e nanopartículas de prata (AgNPs), desenvolvidos por ATTA et al. (2021), apresentaram propriedades mecânicas e térmicas superiores em relação aos filmes de celulose bacteriana pura. Foi comprovado também que os filmes apresentaram viabilidade celular para fibroblastos murino NIH-3T3, sendo considerados atóxicos e biocompatíveis. Os resultados demonstram que o material desenvolvido apresenta aplicação em potencial como materiais de revestimentos e embalagens de alimentos com ação antimicrobiana, pois sua utilização, resultou no aumento da vida útil das frutas testadas (laranjas e maçãs)⁴⁹.

A CB é um biopolímero promissor, sua obtenção é simples e pode ser realizada de maneira sustentável a partir de meios de cultura alternativos. O seu emprego na formação de nanocompósitos, permite o desenvolvimento de materiais multifuncionais e ampliam ainda mais a aplicação desse material.

2.2) Fosfato de Prata

A prata é um elemento empregado para evitar infecções desde a antiguidade, por apresentar um elevado potencial antimicrobiano contra vários microrganismos patogênicos, inclusive bactérias resistentes, e baixa toxicidade para os seres humanos. A utilização de nanopartículas e/ou óxidos de prata, incorporados em materiais distintos, possibilitam o desenvolvimento de produtos com atividade antimicrobiana e múltipla aplicabilidade, presente em diversas áreas: médica, veterinária, odontológica, farmacêutica, filmes e embalagens alimentícias^(17,19,50).

Devido ao tamanho nanométrico das AgNPs, que permitem sua migração pelas barreiras de defesa dos organismos, preocupações voltadas à sua toxicidade para a saúde humana e para o meio ambiente, vêm sendo ponderadas para a sua aplicação, buscando prevenir seus efeitos citotóxicos⁵⁰. Os autores, PARK et al. (2011), GLIGA et al. (2014), e IVASK et al. (2014) relataram que nanopartículas de prata com diâmetro entre 20 nm e 110 nm apresentaram resposta inflamatória e/ou toxicidade para células de mamíferos. Essa elevada toxicidade foi atribuída a capacidade de migração das AgNPs, com tamanhos de aproximadamente 10 nm, e a presença de íons metálicos de Ag^+ , encontrados no interior das células testadas⁽⁵¹⁻⁵³⁾.

Recentes avanços demonstraram o desenvolvimento de excelentes materiais antissépticos constituídos por óxidos de prata, como os três polimorfos de Ag_2WO_4 , β - Ag_2MoO_4 e Ag_3PO_4 , que atuam sem a ação da prata metálica¹⁸.

O fosfato de prata (Ag_3PO_4) é um cristal de estrutura cúbica de corpo centrado (grupo espacial $P\bar{4}3n$), apresenta um *band gap* de 2,43 eV, além da capacidade de absorver energia em comprimentos de onda menores que 530 nm. Essas características estimulam sua aplicação na decomposição de componentes orgânicos sob irradiação da luz visível, devido a rápida evolução de O_2 a partir da água^(18,21-22,68). KAITHERI et al. (2023), incorporaram nanopartículas de Ag_3PO_4 em nanofibrilas de CB para atuar como um fotocatalisador eficiente, reutilizável e ativo na luz visível⁶⁸. Além disso, esse material possui atividade antimicrobiana, antifúngica e antiviral que, aliada à sua baixa toxicidade, tornam esse composto um excelente candidato para aplicações como agente antisséptico em embalagens ativas antimicrobianas e curativos prevenindo contaminações por patógenos^(18,23,68). No entanto a baixa estabilidade do Ag_3PO_4 , em decorrência de sua estrutura, devido à forte interação entre o fósforo e o oxigênio (P-O) nos

tetraedros [PO₄], que resultam no enfraquecimento da ligação Ag-O, e podem levar a dissociação da molécula em Ag⁺ e PO₄³⁻ (23,88). Além da rápida combinação dos pares elétron(e⁻)/buraco (h⁺), que ocasionam a liberação de energia na forma de calor, são fatores que devem ser contornados para a exploração de todo seu potencial ⁴².

Uma das estratégias para garantir a estabilidade dessa substância consiste na utilização de plataformas que permitam a imobilização das micropartículas de fosfato de prata (AgP-MPs) como, por exemplo, polímeros naturais. No recente estudo, realizado por RIBEIRO et al. (2021), o polímero PP se demonstrou uma excelente plataforma para a incorporação do Ag₃PO₄, garantindo a produção de um compósito com ação biocida por contato contra bactérias, fungos e vírus com potencial aplicação biomédica ¹⁸. BÁYON et al. (2018), desenvolveram dispositivos constituídos por celulose bacteriana, AgP-MPs e o antibiótico ciprofloxacina para potencial aplicação em curativos para úlceras ocasionadas por doenças crônicas e/ou queimaduras ¹¹.

O Ag₃PO₄ é considerado um agente antibacteriano de liberação lenta de íons Ag⁺, por apresentar baixa solubilidade em água (K_{sp} = 1.4 10⁻¹⁶, 002 g/L 25 °C) ¹⁷. De acordo com WU et al. (2013), o Ag₃PO₄ também apresenta a capacidade de atuar sem a ação da prata metálica, devido a sua capacidade de ser parcialmente reduzido a coloides. A atividade biológica e fotocatalítica das partículas de Ag₃PO₄ estão diretamente associadas à morfologia dos cristais sintetizados, pois esses fenômenos estão vinculados a superfície do material ^(19,55).

A capacidade intrínseca dos materiais semicondutores de ativar e adsorver moléculas de H₂O e O₂ em superfícies expostas, podem resultar na geração de EROS (Espécies Oxidativas de Oxigênio), como por exemplo, o radical hidroxila (·OH) e o ânion superóxido (·O₂⁻), que estão associadas a

diversos processos bioquímicos (fotossíntese, citotoxicidade), inclusive os responsáveis pela oxidação de substâncias orgânicas, tais como, os constituintes das membranas de microrganismos (bactérias, fungo e vírus) possibilitando a destruição dos patógenos por estresse oxidativo. Além disso, a liberação de íons PO_4^{3-} pode ser prejudicial ao metabolismo das bactérias, ao impedir a conversão de $\text{ATP} \leftarrow \rightarrow \text{ADP}$ otimizando seu efeito antibacteriano ⁵⁶.

STECKIEWICZ et al. (2019), demonstraram que micropartículas Ag_3PO_4 sintetizadas em diferentes morfologias (cúbica, esférica, dodecaédrica rômica, ramos, tetraédrica), apresentaram diferentes níveis de inibição, quando testados contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Candida .albicans*, sugerindo que a diferença existente na superfície das partículas, consequente de sua morfologia, influenciam nas atividades inibitórias e citotóxicas da substância. Além disso, em seu estudo, as micropartículas de morfologia cúbica (1-1,5 μm) apresentaram melhores níveis inibitórios contra os microrganismos testados, mesmo empregado em baixas concentrações de 0,008 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 0,001 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, possivelmente devido a sua maior facilidade em liberar íons Ag^+ , em comparação com outras morfologias, como foi demonstrado por YEO et al. (2015) ⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾.

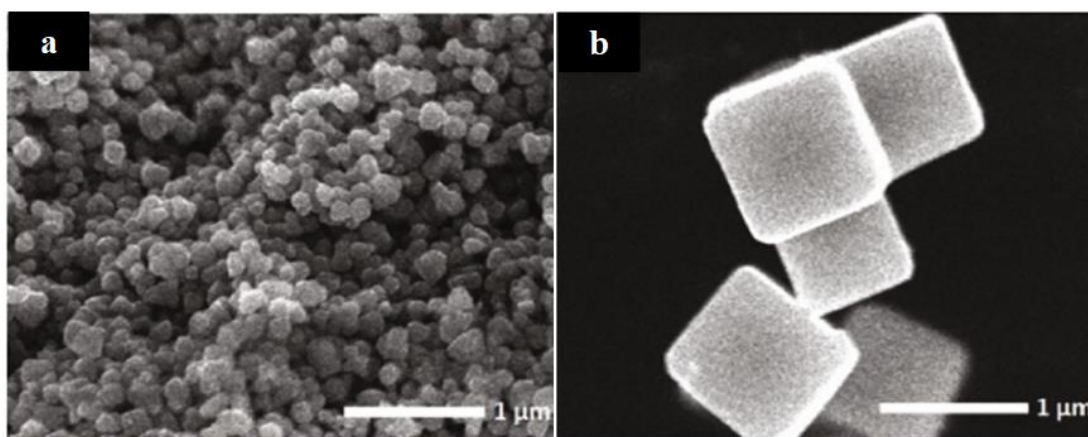


FIGURA 2.4 - Micrografias de Ag_3PO_4 , nas morfologias esféricas (a) e cúbica (b). Fonte: Adaptado ⁵⁵.

Os pesquisadores G. PANTHI et al. (2018) e CHUDOBOVA et al. (2014), evidenciaram em seus estudos que micropartículas de Ag_3PO_4 , com tamanho entre 0,200 – 0,300 μm , podem ser eficazes contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. WU et al. (2014), demonstrou a ação antibacteriana dos microcristais de Ag_3PO_4 de morfologia dodecaédrica, com tamanho na faixa de 500-700 nm, contra as bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* no escuro ^(19,17,58-59).

2.3) Plasma

Estabelecido em 1928, por Irving Langmuir, o termo plasma foi utilizado para designar uma região composta por cargas balanceadas formadas por íons e elétrons, em um gás ionizante ²⁶.

Conforme o aumento de temperatura em um sistema, a energia das moléculas torna-se cada vez maior levando à transformação da matéria nos seguintes estados consecutivos: sólido, líquido, gás e finalmente plasma. O plasma é considerado o quarto estado da matéria, constituído por partículas leves e densas (átomos, moléculas excitadas, íons, radicais e elétrons), tem por definição ser um gás parcial ou totalmente ionizado, que possui características condutoras por ser constituído por espécies carregadas. Para que esse gás ionizado seja definido como plasma alguns parâmetros devem ser estabelecidos ²⁶.

Em seu estado natural, um gás pode conter espécies livres, que incluem elétrons não ligados a átomos e moléculas, cátions e ânions. Considerando um aumento dessas partículas, que resulta na diminuição da

distância entre essas espécies e impulsionam seu movimento através da repulsão entre as cargas de mesmo sinal ocasionando a influência do campo elétrico de uma sobre a outra e fazendo com que elas tenham um comportamento coletivo, diferentemente de um simples gás ^(60,61). A um nível macroscópico, um gás ionizado pode ser definido como plasma, quando existe a neutralidade de suas cargas, decorrente da ausência de perturbações de campos externos atuando sobre o ele. Um sistema, em que os elétrons e os íons estão livres para se movimentarem, uma partícula carregada (n_+) no interior do plasma, é rapidamente anulada pelo surgimento de uma nova partícula carregada de carga oposta (n_-), que mantém o sistema em equilíbrio, pois o número de cargas positivas é praticamente equivalente ao número de cargas negativas ($n_+ = n_-$), nessas condições mantêm-se a ausência das forças externas no plasma. Para preservar essa neutralidade das cargas, o plasma deve exercer sua capacidade de blindagem dos campos eletromagnéticos externos, impedindo quaisquer perturbações de cargas elétricas em seu interior ⁽⁶⁰⁻⁶²⁾.

Esse comportamento pôde ser elucidado, com o auxílio do comprimento de Debye (λ_D), como foi demonstrado por Gomes (2011). Ao considerar a introdução de um eletrodo positivamente carregado de carga esférica com potencial com potencial V_0 , no interior de um plasma, a formação de uma camada de elétrons resulta na blindagem do campo elétrico, devido a anulação de todo o seu potencial V_0 . A medida da espessura desta esfera, formada pela nuvem de elétrons ao redor do eletrodo, pode ser medida por meio da seguinte equação (Equação 2.1), deduzida matematicamente por Debye, com raio λ_D :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 K_b T e}{n_e e^2}} \quad (\text{Equação 2.1})$$

Sendo, ϵ_0 a constante de permissividade elétrica no vácuo, K_b a constante de Boltzmann, T_e a temperatura dos elétrons e n_e é a densidade de elétrons. Lembrando que, o valor do comprimento λ_D deve assumir obrigatoriamente um valor menor que o volume total do sistema, para que haja a ocorrência de plasma. Dessa maneira, a condição de quase neutralidade pode ser atendida, impossibilitando a presença de uma carga não nula no gás ionizado 61-63.

Ademais, o parâmetro de plasma (g), que relaciona a densidade eletrônica com o comprimento de Debye, e é definido pela seguinte expressão:

$$g = \frac{1}{ne\lambda_D^3} \quad (\text{Equação 2.2})$$

Determina que a quantidade de partículas no interior de uma esfera de Debye deve ser grande, tal que, $g \ll 1$, para que o conceito de blindagem de Debye tenha validade e, portanto, um gás ionizado seja considerado plasma.

Outro parâmetro que deve ser considerado, é o movimento coletivo das partículas, determinado por uma oscilação atribuída a frequência do plasma (ω_{pe}), representado pela seguinte expressão:

$$\omega_{pe} = \left(\frac{ne^2}{m\epsilon_0} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Equação 2.3})$$

Onde m_e corresponde a massa do elétron. A partir dessa expressão é possível medir a densidade do plasma. Para que o plasma exista, é necessário que quando ocorra um aumento na densidade das partículas neutras o tempo médio entre as colisões (τ), da partícula neutra e da partícula carregada (elétron), deve ser inferior ao período de oscilação ao plasma, sendo que: $\omega_p\tau > 1$ 61-63.

A tecnologia do plasma consiste numa área em expansão na ciência, pois além de sua ocorrência natural (como os relâmpagos, a aurora boreal e o próprio sol), o plasma pode ser facilmente obtido em laboratório, sob diferentes condições de temperatura e pressão. Além de algumas de suas características principais, que incluem, sua elevada capacidade de produzir energia e concentrações elevadas de espécies quimicamente ativas (átomo, elétrons, íons, radicais, fótons de distintos comprimentos de onda) em temperatura ambiente, permitindo a sua vasta aplicação em diferentes áreas: termonuclear, microeletrônica, síntese; podendo ser empregado na esterilização de superfícies, deposição e corrosão de filmes finos, descontaminação química, impermeabilização de tecidos, na fabricação de lasers etc ⁽²⁶⁻²⁷⁾.

2.3.1) Tratamento a Plasma *Etching* de Oxigênio

O tratamento a plasma possibilita a modificação da superfície de polímeros sem que ocorra a alteração de suas propriedades de *bulk*. Uma vantagem, já que alterações de *bulk* podem influenciar nas propriedades mecânicas do material. Esta técnica oferece parâmetros de descarga: potência, gás, pressão distintos que podem ser alterados de acordo com a modificação desejada ²⁴. A exposição ao plasma pode criar grupos funcionais na superfície polimérica, que incluem: CO, OH, COOH, ROH, NH₂ e ROR (carbonila, hidroxila, carboxila, aldeído e amina e éter), aumentando a energia superficial do material ⁶⁴. Além disso, esta técnica pode promover a modificação da superfície do material devido aos processos de corrosão ou degradação que ocorrem durante a irradiação plasmática gerando uma colisão de íons espécies reativas e radiação UV sem a utilização de qualquer produto químico ^(15,14, 24, 27).

Para aplicações biomédicas, o acabamento da superfície de um polímero tem bastante importância, por ser o primeiro o contato entre o material e as biomoléculas, portanto características como rugosidade, molhabilidade, carga superficial, adesão e densidade de superfície interferem na biocompatibilidade dos materiais ^(14,15, 29).

A partir do plasma *etching* a superfície do material pode sofrer uma “corrosão” ocasionada pelo bombardeamento de espécies altamente reativas provocadas pela ionização de um gás, como o O₂, e sua interação com os constituintes da superfície da amostra ^(14,15,64). Esse efeito *etching* pode resultar na exposição de partículas incorporadas em materiais compósitos intensificando suas características ^(25,65).

PERTILE et al. (2010) empregaram o plasma de nitrogênio, na modificação da superfície da celulose bacteriana, para aumentar, além da concentração de grupos funcionais na superfície da CB, a rugosidade do material, melhorando sua adesão celular para potencializar a biocompatibilidade *in vivo* desse biopolímero.

O plasma de oxigênio foi utilizado por BENEVUTO et. al (2023) para alterar as propriedades físico-químicas da celulose bacteriana, e estudar a viabilidade celular do biopolímero após a modificação. Nesse estudo foi verificado que a celulose bacteriana modificada pelo tratamento a plasma durante 5 minutos, promoveu um aumento da adesão às células do tecido ósseo, resultando em uma plataforma para estimular o crescimento celular.

No estudo realizado por ESPAÑA-SÁNCHEZ et al. (2014), foi verificada a modificação da superfície dos compósitos de polipropileno e nanopartículas de cobre, utilizando-se plasma de oxigênio, devido ao aumento na rugosidade e a na polaridade superficial dos nanocompósitos. A atividade antibacteriana dos compósitos foi atribuída a exposição das nanopartículas de cobre, inseridas na matriz de PP, pois as amostras dos

nanocompósitos antes do tratamento a plasma não apresentaram efeito inibitório contra as bactérias testadas (*S. aureus* e *P. aeruginosa*). Entretanto, após ao tratamento a plasma as amostras apresentaram efeito antibacteriano após 3 h de interação com as bactérias.

3. Objetivos

3.1) Objetivos Gerais

Este trabalho tem como hipótese que o tratamento de compósitos por plasma *etching* de oxigênio promovem a exposição das micropartículas de Ag_3PO_4 sob a superfície do material otimizando seus efeitos antimicrobianos. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo produzir compósitos constituídos a partir de uma matriz de celulose bacteriana e diferentes concentrações de fosfato de prata, para posteriormente realizar a modificação superficial pelo tratamento a plasma de oxigênio, a fim intensificar as propriedades antimicrobianas do material, por meio da exposição das micropartículas de Ag_3PO_4 na superfície do compósito.

3.2) Objetivos Específicos

Desenvolver um método de síntese eficaz para a produção dos compósitos, por meio da incorporação de diferentes concentrações de Ag_3PO_4 na matriz polimérica de CB.

Avaliar a influência do semicondutor nas propriedades físico-químicas do biopolímero.

Determinar a viabilidade celular dos filmes compósitos desenvolvidos, bem como identificar seu potencial antimicrobiano.

Avaliar o impacto da modificação por plasma no potencial antimicrobiano do material.

4. Materiais e Métodos

4.1) Materiais e Reagentes

Os filmes de celulose bacteriana hidratados foram gentilmente fornecidos pela empresa HB Biotech (Araraquara, SP - Brasil). Esse material foi sintetizado por meio da cepa AF1 da bactéria *Komagataebacter xylinus*, em modo de cultivo estático em incubadora BOD.

Os reagentes utilizados para a síntese “*in situ*” das partículas de Ag_3PO_4 nos filmes de CB, foram descritos na TABELA 4.1.

TABELA 4.1 Reagentes utilizados na Síntese do Ag_3PO_4 .

Reagentes	Pureza (%)	Origem
Fosfato dissódico - Na_2HPO_4	98	Êxodo Científica
Nitrato de Prata - AgNO_3	99	Sigma-Aldrich

4.2) Metodologia

A metodologia foi esquematizada em quatro etapas, consistindo em:

Etapa A). Síntese dos Filmes Compósitos de CB/ Ag_3PO_4

Etapa B). Avaliação da Influência das Partículas de Ag_3PO_4 nos Filmes de Celulose Bacteriana

Etapa C). Modificação da CB pura e dos Compósitos de CB/Ag₃PO₄ pelo Tratamento a Plasma de Oxigênio

Etapa D). Avaliação das Modificações Promovidas pelo Tratamento a Plasma de Oxigênio

A metodologia desse trabalho foi estabelecida após ensaios preliminares que buscavam desenvolver um material híbrido, com propriedades antimicrobianas buscando ampliar a aplicabilidade do filme compósito obtido. Nesse contexto, foi proposta uma metodologia onde utiliza-se um funil de Büchner de placa porosa na etapa de incorporação das partículas de fosfato de prata à matriz polimérica, para forçar a formação desses cristais na superfície dos filmes de celulose bacteriana, garantindo a confecção de um material atóxico, com elevada biocompatibilidade e potencial atividade antimicrobiana. Contudo, com base nos resultados obtidos por meio de um teste de viabilidade celular, baseado na ISO 10993-12, foi demonstrado (Anexo I) que os filmes compósitos sintetizados apresentaram elevada toxicidade para as células, com uma redução drástica da viabilidade celular para porcentagens bem abaixo de 70%, inviabilizando a continuação da pesquisa nas concentrações previamente definidas. Diante disso, fez-se necessário definir novos parâmetros de síntese, para a produção de novos materiais atóxicos. A partir de um novo levantamento bibliográfico, aliado, sobretudo às análises termogravimétricas (5.3) e posterior teste de viabilidade celular (5.5), foi possível estabelecer novos parâmetros para a síntese dos compósitos de CB/Ag₃PO₄ descritas na Etapa A.

Etapa A): Síntese dos Filmes Compósitos a Base de CB/Ag₃PO₄

Inicialmente, os filmes de CB hidratados foram cortados em discos com diâmetros de aproximadamente 3,5 cm e suavemente prensados durante 24h para remover o excesso de água adsorvida ao material. Em seguida cada

filme foi imerso em 50 mL de solução $5 \cdot 10^{-6}$, $2,5 \cdot 10^{-5}$ e $5 \cdot 10^{-5}$ mol do sal redutor Na_2HPO_4 permanecendo por 24 horas em temperatura ambiente, sob agitação constante (110 rpm) na incubadora (Incubadora Shaker SL-222/125 – Solab Científica). Os filmes de CB concentrados em solução de Na_2HPO_4 (CB/Fosfato) foram transferidos para um funil de Büchner de placa porosa (50 mL), acoplado a um sistema de filtração a vácuo. Em seguida 50 mL de solução $5 \cdot 10^{-6}$, $2,5 \cdot 10^{-5}$ e $5 \cdot 10^{-5}$ mol de AgNO_3 foi vertida sobre o filme, seguido pelo acionamento da bomba de vácuo (Bomba de Vácuo e Compressor - Primatec – 121), iniciando a síntese das partículas de Ag_3PO_4 diretamente na matriz da CB. Após a completa drenagem da solução de AgNO_3 , os filmes compósitos são lavados com 10 mL de água destilada dentro do funil. Finalmente, os filmes compósitos resultantes denominados $0,0001_CB/\text{Ag}_3\text{PO}_4$, $0,0005_CB/\text{Ag}_3\text{PO}_4$ e $0,001_CB/\text{Ag}_3\text{PO}_4$ foram encaminhados para secagem em estufa a vácuo, a 60°C .

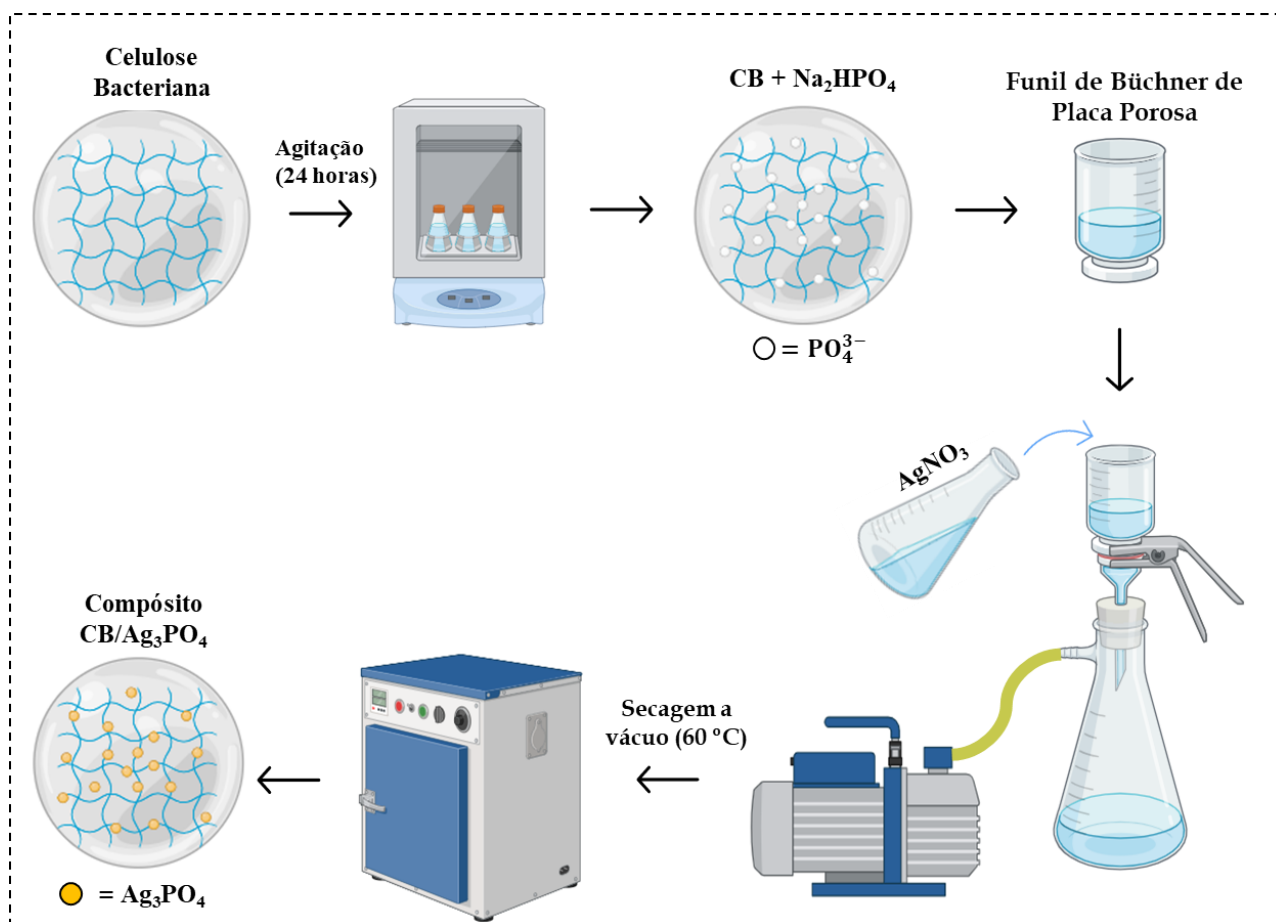


FIGURA 4.1 - Esquema ilustrativo do processo de síntese dos filmes compostos de celulose bacteriana e fosfato de prata (CB/Ag₃PO₄). Fonte: Elaborado pela autora através do site BioRender.com.

Etapa B): Avaliação da Influência das Partículas de Ag₃PO₄ nos Filmes de Celulose Bacteriana

Os filmes compostos sintetizados foram caracterizados através de análises físico-químicas, estruturais e morfológicas por meio das seguintes técnicas: (i) Espectroscopia de Transmitância na região do Infravermelho com transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR), (ii) Difração de Raios X (DRX) e (iii) Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV-EDS). Para estudar a estabilidade térmica dos materiais sintetizados, foram feitas as

seguintes análises térmicas: (i) Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e (ii) Análise Termogravimétrica (TGA). Para investigar propriedades como o caráter hidrofílico/hidrofóbico e a molhabilidade, que surgem da interação entre a superfície de um material sólido e um líquido foram realizadas medidas de ângulo de contato (θ). O Ensaio de citotoxicidade celular foi realizado avaliar a segurança dos filmes compósitos e viabilizar sua aplicação como dispositivos médicos. Todas as análises dos filmes de celulose bacteriana e dos compósitos de CB/Ag₃PO₄ foram realizadas nas amostras secas em estufa a vácuo, em temperatura de 60 °C.

4.3) Espectroscopia de Transmitância na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflectância Atenuada (FTIR-ATR)

A partir desta técnica, foram investigadas as possíveis alterações químicas ocasionadas nos filmes de celulose bacteriana após a incorporação das partículas de Ag₃PO₄.

As análises de FTIR-ATR dos filmes compósitos e dos filmes de CB pura, foram realizadas em duplicata, por meio de um espectrofotômetro de infravermelho ThermoNicolet, modelo Nexus 6700 FT-IR com um acessório (cristal de germânio) de refletância total atenuada (ATR - Thunderdome) acoplado. Foram efetuadas varreduras de 64 scans de 4 cm⁻¹, na faixa de 4.000 a 400 cm⁻¹.

4.4) Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV-EDS)

A partir desta análise é possível obter imagens de alta resolução da superfície da amostra examinada, além de informações sobre a composição química e a morfologia do material, utilizando-se um feixe de elétrons para produzir imagens. A presença e a dispersão das partículas de Ag_3PO_4 incorporadas nos filmes de CB, assim como, a morfologia dos materiais compósitos, foram analisadas por meio desta técnica. Além disso, foi realizado o mapeamento dos elementos presentes nos filmes compósitos por meio de espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

Nesta análise, foi utilizado o microscópio Philips, modelo FEG XL30. As amostras foram recobertas por tinta ouro e a análise da seção transversal foi realizada após a fratura criogênica das amostras, previamente imersas em nitrogênio (N_2) líquido.

4.5) Difração de raios X (DRX)

Por meio desta técnica a fase cristalina dos filmes de celulose bacteriana e dos filmes compósitos de $\text{CB}/\text{Ag}_3\text{PO}_4$ foi investigada utilizando-se um difratômetro Shimadzu (XRD LabX - 6000), com tensão de 30 kV e corrente de 30 mA. Os scans foram obtidos no intervalo de 5 a 90° , em passo de 0,02 e taxa de $2^\circ/\text{min}^{-1}$, com uma fonte de radiação de $\text{Cu-K}\alpha$, correspondente a 1,54 Å.

A difração de raios X é amplamente empregada na caracterização de fases cristalinas, pois cada fase cristalina possui seu próprio perfil de difração, logo, por meio desta técnica é possível obter resultados com rapidez e confiabilidade.

4.6) Análise Termogravimétrica (TGA)

A influência das diferentes concentrações de Ag_3PO_4 , incorporadas aos filmes de celulose bacteriana, nos processos de perda de massa e na estabilidade térmica do biopolímero foi investigada por meio da análise termogravimétrica (TGA).

O equipamento empregado nesta análise foi um TG 209F3 Maia, NETZSCH. A análise foi realizada em atmosfera oxidativa de oxigênio, com taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, na faixa de $25\text{ }^\circ\text{C}$ a $700\text{ }^\circ\text{C}$.

4.7) Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica que mede a diferença de energia (em termos de entalpia) que ocorre no material, devido às variações controladas de temperatura.

A partir desta análise foi possível determinar o efeito da incorporação das partículas de Ag_3PO_4 nos filmes de celulose bacteriana. As análises DSC foram realizadas no equipamento DSC NETZSCH 203 F3–Maia, de fluxo de potência. Para esta análise, as amostras foram dispostas em uma panelinha de alumínio, com a tampa furada, analisadas em duplicata sob atmosfera inerte de gás N_2 , à um fluxo de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e taxa de aquecimento à $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, de acordo com os seguintes parâmetros: primeiro aquecimento de 20 a $150\text{ }^\circ\text{C}$, isoterma de 3 minutos, resfriamento até $20\text{ }^\circ\text{C}$ e segundo aquecimento até $390\text{ }^\circ\text{C}$.

4.8) Ângulo de Contato (θ)

A superfície de um material pode ser classificada como hidrofílica, super hidrofílica e hidrofóbica mediante os seguintes critérios. Quando um líquido se espalha naturalmente sobre uma superfície e, a mesma, apresenta uma medida de ângulo de contato menor que 90° , esse material é considerado hidrofílico. Quando o espalhamento do líquido ocorre de maneira instantânea, ao entrar em contato com uma superfície, ele é considerado super hidrofílico ($\theta < 10^\circ$). Um material é classificado como hidrofóbico, quando não ocorre o molhamento da superfície sólida pelo líquido e, sua medida de ângulo de contato, é maior 90° .

Através dessa medida quantitativa, foi possível calcular a tensão superficial do biopolímero, por meio definição das componentes dispersivas e polares dos filmes de celulose bacteriana antes e após a inserção das partículas de Ag_3PO_4 , empregando-se as equações definidas por SOUHENG WU ⁹⁴. Além disso, as alterações na superfície dos filmes de celulose bacteriana após a inserção das partículas de Ag_3PO_4 , que influenciam nas propriedades relacionadas a molhabilidade do biopolímero, puderam ser avaliadas, bem como as alterações ocasionadas na superfície após o tratamento a plasma de O_2 .

As medidas de ângulo de contato dos filmes de CB pura e dos compósitos de $\text{CB}/\text{Ag}_3\text{PO}_4$, foram realizadas com o auxílio do goniômetro (Ramé-Hart 260-F) pelo método de gota séssil. Em cada amostra, foram realizadas três medições para cada gota, totalizando 9 medidas para cada amostra, e as análises foram realizadas em duplicata. Os líquidos-sonda utilizados foram água destilada e diiodometano (NEON, 99% P.A).

4.9) Ensaio de Citotoxicidade Celular

A avaliação da citotoxicidade celular ⁽⁹⁹⁻¹⁰¹⁾ foi realizada com base na ISO10993-12 ⁹⁹. As células dos fibroblastos murino, provenientes do tecido conjuntivo, foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) complementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL), com posterior incubação em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após dois repiques consecutivos, iniciou-se o ensaio de citotoxicidade, empregando-se 2x10⁴ células/poço em placa de 96 poços. A placa foi incubada durante 24 h, seguindo os mesmos parâmetros de temperatura e porcentagem de CO₂ descritos anteriormente. Os meios de extração, empregando-se os filmes de CB/Ag₃PO₄, foram simultaneamente preparados da seguinte maneira: 3 cm² de cada amostra foram dispostas em um tubo cônico de 15 mL e mantidos sob radiação ultravioleta por 30 minutos.

Posteriormente, cada tubo foi completado com 3 mL de meio de cultura (DMEM + 10% de SFB), onde permaneceram sob agitação durante 24 horas a 37 °C. Finalizado o período de agitação, os meios foram filtrados utilizando-se filtro de seringa (0,22 µm). Em seguida, os meios de extração provenientes de cada amostra foram inseridos sobre a monocamada celular adicionando 100 µL/poço e posteriormente foram incubados em estufa de gás carbônico (CO₂) durante 24 h. Após esse período, os meios de extração foram retirados e lavados com solução *Phosphate Buffer Saline* (PBS 1X) duas vezes consecutivas. Seguidamente, adicionou-se em cada poço, 100 µL de solução de MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*), diluído na concentração de 1 mg/mL. Novamente, a placa seguiu para incubação a 37°C, sob o abrigo da luz durante aproximadamente 3 horas, até que fosse observada a formação dos cristais de violeta de formazana. Decorrido o período de incubação, adicionou-se 50 µL de álcool

isopropílico absoluto para dissolver os cristais de formazana e o MTT totalmente removido dos poços.

Foi realizada a análise espectroscópica, obtendo-se os valores de absorvância (Abs) por meio de um espectrofotômetro de microplacas (SoftMax® Pro 5), no comprimento de onda a 570 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, em três análises independentes, incluindo os controles ¹⁰¹. As células tratadas com DMEM + 10% SFB foram determinadas como controle de sobrevivência. Para o branco, os poços foram mantidos apenas com os reagentes utilizados em cada etapa do experimento. Utilizando-se os valores de Abs, foi calculada a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de sobrevivência (100%), de acordo com a equação abaixo ¹⁰⁰:

$$\frac{(Abs\ da\ amostra - Abs\ branco)}{(Abs\ do\ controle\ de\ sobrevivência - Abs\ branco)} \times 100$$

Esse ensaio foi realizado no laboratório de Biopolímeros e Biomateriais (BioPolMat) da universidade UNIARA, em Araraquara.

4.10) Análise Estatística

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias de Tukey ($p \geq 0,05$) utilizando-se o programa RStudio¹⁰².

Etapa C): Modificação a Plasma dos Filmes Compósitos de CB/Ag₃PO₄

Plasma Etching

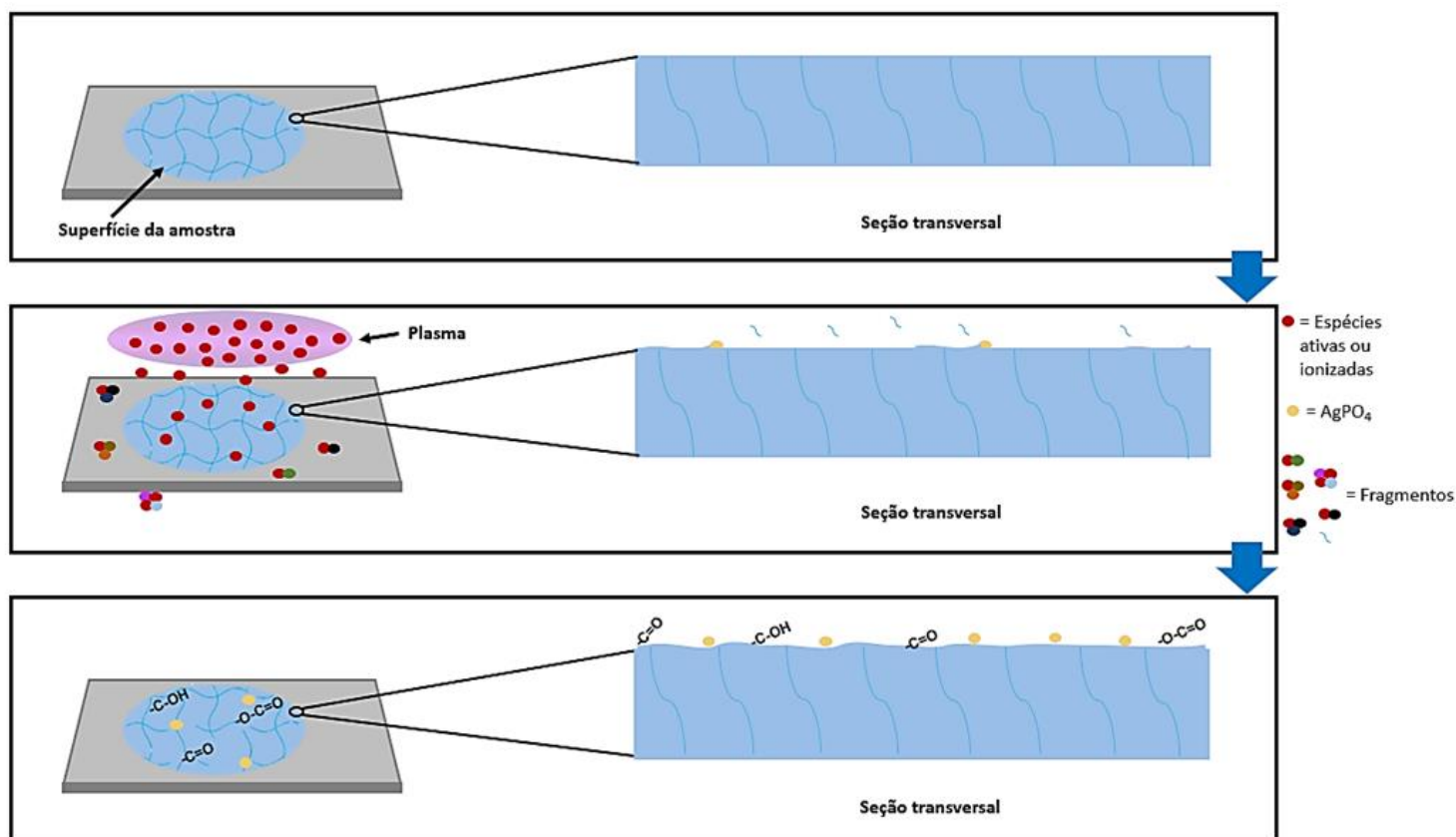


Figura 4.2 - Esquema ilustrativo da exposição por plasma de oxigênio nos filmes de CB. Fonte: Elaborado pela autora através do site BioRender.com.

O tratamento a plasma dos filmes de CB e dos filmes de CB/Ag₃PO₄ foram realizados utilizando um reator a plasma VACUTECH. O sistema é constituído por uma câmara de vácuo, contendo dois eletrodos (um na parte superior e outro na parte inferior) de placas circulares separados por uma distância de aproximadamente 30 cm. Acoplado a esse sistema estão um gerador de radiofrequência, que opera a 13,56 Hz, um regulador e medidor de potência e pressão.

Os parâmetros utilizados foram determinados com base em estudos preliminares que demonstraram a modificação de superfícies de polímeros

por plasma ^(15,29,64,89,96). A superfície das amostras foram tratadas a plasma, variando-se a exposição por 2,5 e 5 minutos. Para a geração do plasma, foi utilizado o gás oxigênio (O₂), introduzido a um fluxo de 50 sccm, operando a 70 W de potência, com pressão de 0,70 Torr. Após o tempo de exposição, as amostras permanecem na câmara fechada durante 15 minutos, para que ocorra uma leve estabilização nas reações que, porventura, ainda estejam ocorrendo na superfície do material.

As amostras dos filmes compósitos de CB/Ag₃PO₄ selecionadas para o prosseguir nesta etapa foram as amostras sintetizadas nas concentrações limites dos reagentes precursores (Na₂HPO₄ e AgNO₃), sendo a menos concentrada 0,0001 mol·L⁻¹ e a mais concentrada, 0,001 mol·L⁻¹. Portanto, para simplificar o entendimento durante a leitura, as amostras foram nomeadas de acordo com a TABELA 4.2.

TABELA 4.2 – Nomenclatura das amostras submetidas ao tratamento a Plasma de oxigênio

Tempo de Exposição ao Plasma	Celulose Bacteriana	0,0001_CB/Ag₃PO₄	0,001_CB/Ag₃PO₄
2,5 minutos	CBP – 2,5 min	1P – 2,5 min	2P – 2,5 min
5 minutos	CBP – 5min	1P – 5 min	2P – 5 min

Etapa D): Avaliação das Modificações Promovidas pelo Tratamento a Plasma de Oxigênio nos Filmes de CB e nos Compósitos de CB/Ag₃PO₄

As modificações químicas superficiais foram avaliadas por meio das técnicas de espectroscopia de transmitância na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR) e ângulo de contato (θ). As alterações topográficas foram analisadas por microscopia de força atômica (AFM).

4.11) Espectroscopia de Transmitância na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflectância Atenuada (FTIR-ATR)

A partir desta técnica, foram investigadas as possíveis modificações químicas provocadas pelo tratamento à plasma de oxigênio na superfície dos compósitos de CB/Ag₃PO₄. As análises de FTIR-ATR dos filmes de CB pura e dos filmes compósitos, foram realizadas em duplicata, obtidas por meio de um espectrofotômetro de infravermelho Agilent Cary 630 FTIR com um acessório de refletância total atenuada acoplado. Foram realizadas varreduras de 16 scans de 4 cm⁻¹, na faixa de 4.000 a 650 cm⁻¹.

4.12) Ângulo de Contato (θ)

As medidas de ângulo de contato dos filmes de CB pura e dos compósitos de CB/Ag₃PO₄ após o tratamento a plasma, foram realizadas com o auxílio do goniômetro (Ramé-Hart 260-F) pelo método de gota séssil. Em cada amostra, foram realizadas três medições para cada gota, totalizando 9 medidas para cada amostra, e as análises foram realizadas em duplicata. Foram utilizados como líquidos-sonda água destilada e diiodometano (NEON, 99% P.A).

4.13) Microscopia de Força Atômica (AFM)

As mudanças topográficas das amostras após o tratamento a plasma, foram investigadas por meio das análises de Microscopia de Força Atômica (AFM). O microscópio utilizado nesta análise foi o Multimode 8 (Bruker),

utilizando a técnica PeakForce Quantitative Nanomechanical Mapping (QNM) e sondas com constante de mola 0,4 N/m e 2,8 N/m. O software Gwyddion foi utilizado no tratamento e na análise das micrografias. Essa análise foi realizada com suporte do LNNano – Laboratório Nacional de Nanotecnologia, CNPEM/MCTIC.

4.14) Ensaio de Atividade Antimicrobiana

A análise da atividade biológica dos materiais foi realizada por meio da técnica de difusão em ágar com base nas normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* M2-A8¹⁰⁴ (CLSI M2-A8). Inicialmente, as amostras foram cortadas em círculos de Ø 16 mm. Para essa análise, os discos de antibióticos foram substituídos pelos seguintes grupos de amostras testadas: (i) filmes de celulose bacteriana pura (CB) e (ii) filmes compósitos de CB/Ag₃PO₄ antes e após a (iii) modificação por plasma de oxigênio. Esses materiais foram avaliados em conjunto com os seguintes grupos: (iv) controle negativo (-): disco de papel filtro embebido em água destilada previamente esterilizada; (v) controle positivo (+): disco de papel filtro embebido em solução de digluconato de clorexidina (CHX) 0,12%. Os microrganismos empregados nesta análise foram as bactérias gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e gram-negativa *Eschericia coli* (ATCC 25922) e o fungo *Candida albicans* (SC5314). Ambas as bactérias foram reativadas utilizando o meio de cultura Tryptic Soy Agar – Soybean-Casein Digest Agar (TSA) sob condições aeróbias a 37°C. A cepa de *Candida albicans* foi reativada utilizando-se o meio de cultura Ágar Sabourand Dextrose (SDA) sob as mesmas condições. A padronização das densidades das soluções para o preparo do inóculo foi realizada utilizando-se a solução de McFarland 0,5 (aproximadamente 1x10⁸ células/mL). O

material inoculado nas placas de Petri permaneceu em repouso durante 3 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram posicionadas de maneira equidistante sobre o ágar e após 15 minutos de repouso, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 18 h. Esse ensaio antimicrobiano foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Microbiologia da (LPBM) da Unesp, em Araraquara.

5. Resultados e Discussões

5.1) Avaliação da Influência das Partículas de Ag_3PO_4 nos Filmes de Celulose Bacteriana

Para a imobilização eficiente das partículas de Ag_3PO_4 na matriz de CB, foi desenvolvida uma metodologia de síntese “*in situ*” empregando-se um sistema de filtração a vácuo intencionando a formação dos cristais de Ag_3PO_4 de maneira homogênea diretamente na matriz dos filmes de CB, por meio da criação de um gradiente de concentração de partículas.

Inicialmente, os filmes de CB foram imersos durante 24 horas na solução do sal fosfato dissódico (Na_2HPO_4). A concentração dos filmes de CB na solução de Na_2HPO_4 estimula o aumento de sítios redutores, devido a dissociação dessa molécula em cátions de sódio (Na^+) e ânions hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) (Reação 5.1), seguido da hidrólise do ânion fosfato (PO_4^{3-}) (Reação 5.2). Dessa maneira, a interação dipolo-dipolo, entre o íon PO_4^{3-} com os grupos hidroxila (OH) presentes por toda a estrutura da celulose bacteriana é viabilizada (FIGURA 5.1), favorecendo a posterior imobilização dos micro cristais de Ag_3PO_4 nos poros da CB ^(66,68), dificultando a lixiviação das partículas.

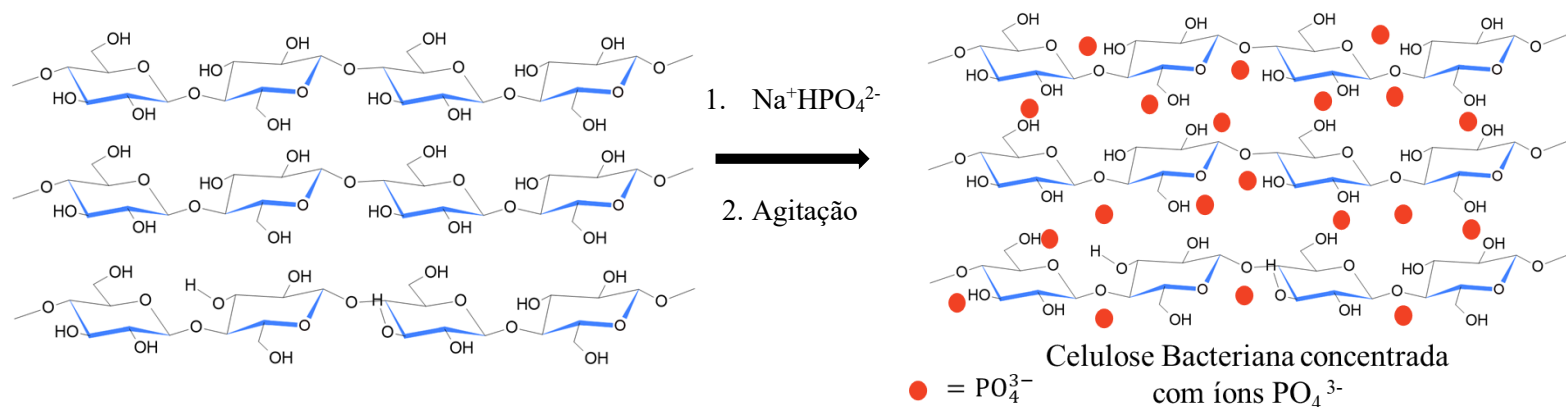
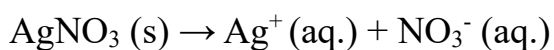


FIGURA 5.1 – Desenho esquemático da possível reação entre a celulose bacteriana e o fosfato dissódico.

A formação dos compósitos é realizada imediatamente após a completa filtragem da solução de nitrato de prata (AgNO_3). Como hipótese, a formação dos cristais de Ag_3PO_4 ocorre mediante a reação entre o cátion Ag^+ , que é reduzido a Ag^0 , e os ânions PO_4^{3-} adsorvidos no filme de CB, (FIGURA 5.1) provenientes da hidrólise do HPO_4^{2-} (Reação 5.1) e da dissociação do AgNO_3 , (Reação 5.3), ocorrendo a formação “*in situ*” das partículas de Ag_3PO_4 na matriz de CB. Nesta etapa é possível que ocorra a formação de espécies AgOH , porém, em quantidades muito pequenas decorrente da interação entre os íons Ag^+ e HPO_4^- , e posterior decomposição em espécies Ag_2O ^(24,46,68).

Reação 5.3: Dissociação do Nitrato de Prata (AgNO_3)



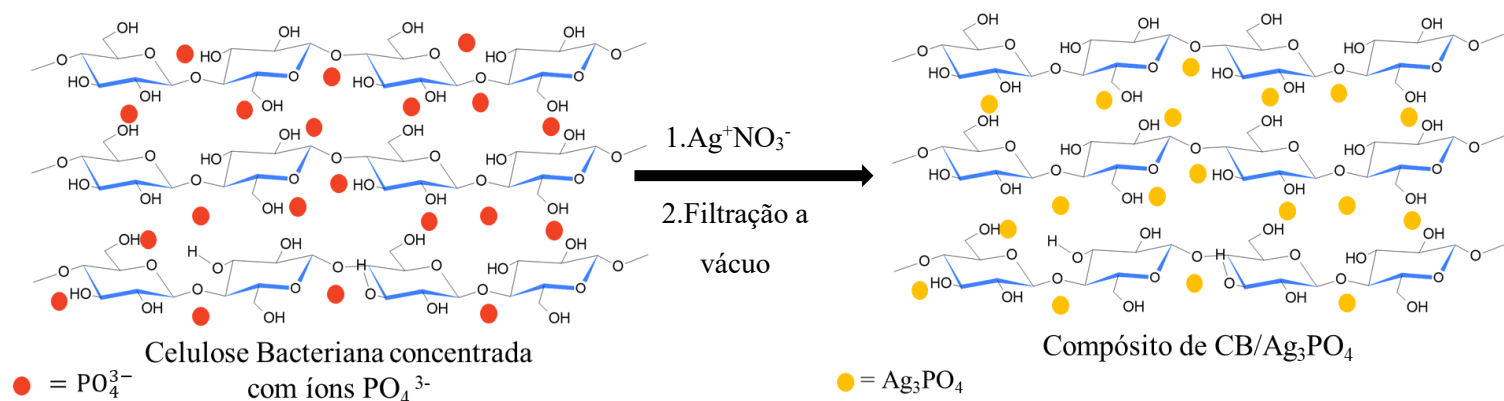


FIGURA 5.2 – Desenho esquemático da reação entre a celulose bacteriana concentrada com íons fosfato e o nitrato de prata.

Após a completa drenagem da solução de AgNO_3 , as amostras são filtradas com 10 mL de água (H_2O) destilada. O composto é retirado do funil e, em seguida, é lavado com mais água destilada para remover quaisquer resíduos dos reagentes precursores não reagidos. Durante esse processo não foi observada a presença de partículas no filtrado, que permaneceu incolor, indicando que não houve a lixiviação de partículas. Os filmes compostos de CB/ Ag_3PO_4 foram secos em estufa a vácuo á 60°C .

5.2) Avaliação da Influência das Partículas de Ag_3PO_4 nos Filmes de Celulose Bacteriana

Nos espectros de FTIR-ATR (FIGURA 5.3) foi possível verificar as principais bandas de absorção que caracterizam a CB. O espectro de FTIR da amostra de CB pura apresenta uma banda de absorção alargada na região de 3.400 a 3200 cm^{-1} , correspondente à vibração de estiramento presente na ligação entre O-H (grupo hidroxila), característica da CB. As pequenas bandas de absorção, identificadas em 2.907 cm^{-1} e 2.852 cm^{-1} , podem ser

atribuídas a vibração de estiramento simétrico, correspondente a ligação entre C-H e a vibração de estiramento assimétrico presente na ligação H-C-H. A região de transmitância na região de 3.000 e 2.800 cm^{-1} , é correspondente as vibrações dos grupos CHOH e CH_2OH ^(10,29-30,97). A banda de absorção em 1636 cm^{-1} corresponde a deformação do grupo H-O-H, correspondente a água adsorvida. As pequenas bandas de absorção, em 1420 cm^{-1} e 1340 cm^{-1} , correspondem as deformações das ligações H-C-H e O-H, respectivamente. Finalmente, na região de 1164 cm^{-1} a 1055 cm^{-1} , é possível observar as pequenas bandas de absorção atribuídas ao alongamento nas ligações entre C-O-C, correspondente a ligação β -1,4 glicosídica, e o aos estiramentos da ligação C-O.

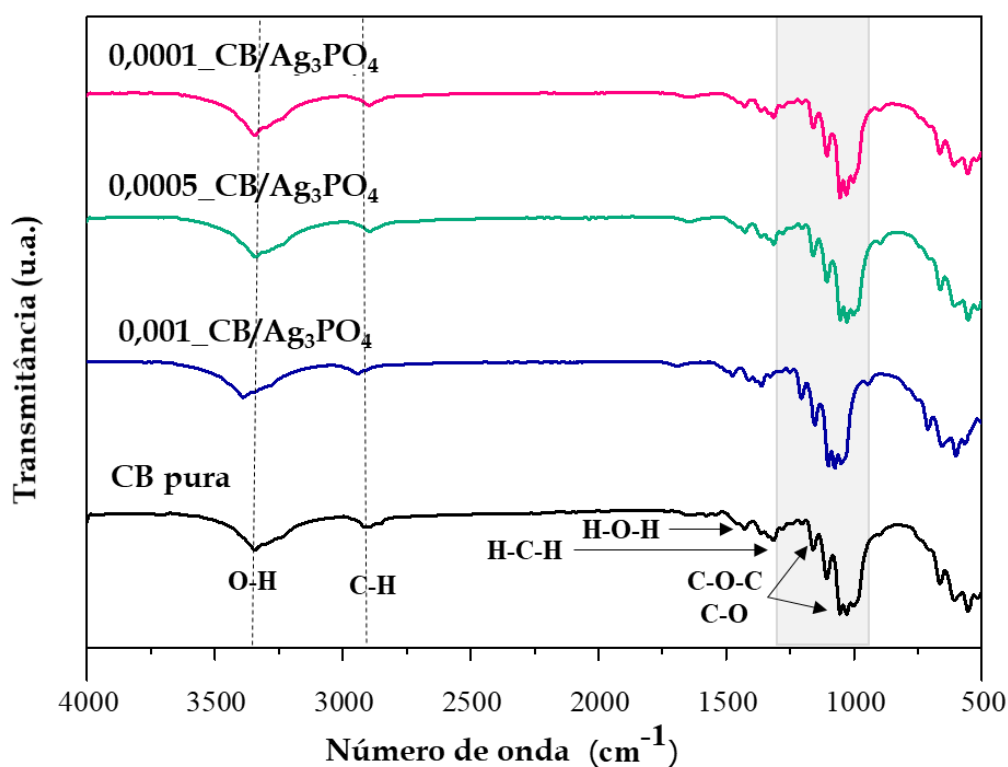


FIGURA 5.3 - Espectros de absorção de FTIR das amostras de celulose bacteriana pura e dos filmes compósitos de CB/Ag₃PO₄ na região de 4.000 a 500 cm^{-1} .

Como foi notada apenas uma sutil diferença entre os espectros dos filmes de celulose bacteriana pura e dos compósitos de CB/Ag₃PO₄, os espectros de FTIR-ATR foram ampliados nas regiões de 4000 a 1500 cm⁻¹ (FIGURA 5.4) e 1500 a 500 cm⁻¹ (FIGURA 5.5), para que as diferenças entre eles possam ser discutidas e observadas com mais clareza.

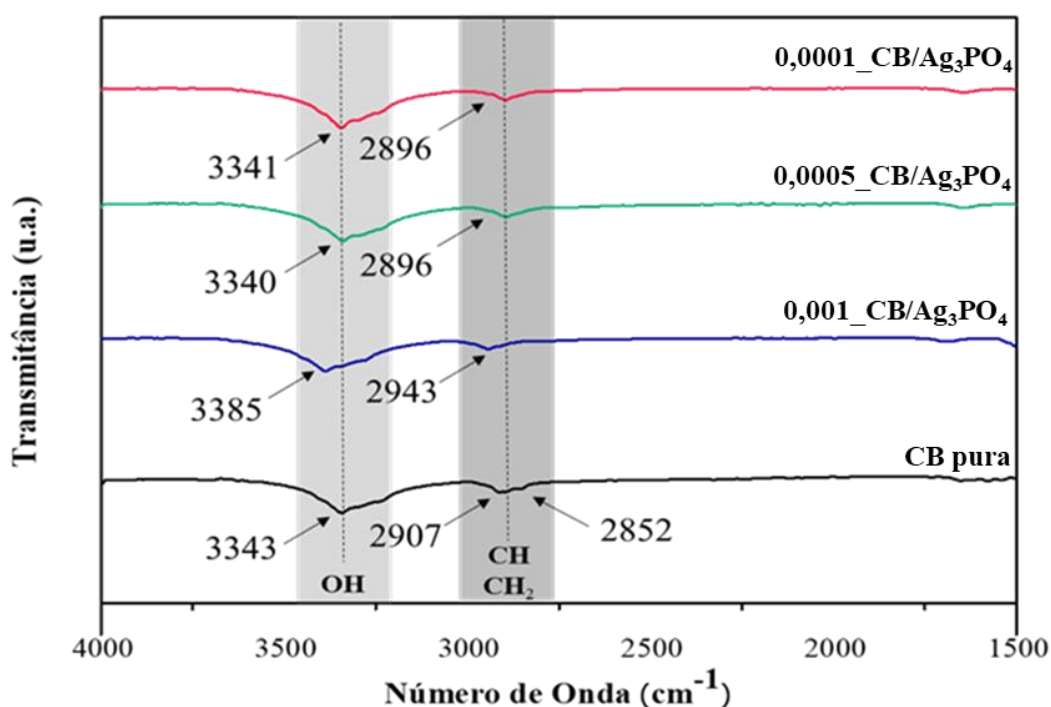


FIGURA 5.4 - Espectros de absorção de FTIR das amostras de celulose bacteriana pura e dos filmes compósitos de CB/Ag₃PO₄ na região de 4000 a 1500 cm⁻¹.

O espectro de FTIR da amostra 0,001_CB/Ag₃PO₄ deslocou-se para a esquerda em relação ao espectro de absorção da amostra de CB pura (FIGURA 5.4), assim como as amostras 0,0001_CB/Ag₃PO₄ e 0,0005_CB/Ag₃PO₄ foram levemente deslocadas. Esses deslocamentos sugerem uma forte interação entre a substância inorgânica e o biopolímero, correspondente aos grupos polares e/ou polarizáveis do fosfato e sua associação com os grupos hidroxila da CB ^(17,37).

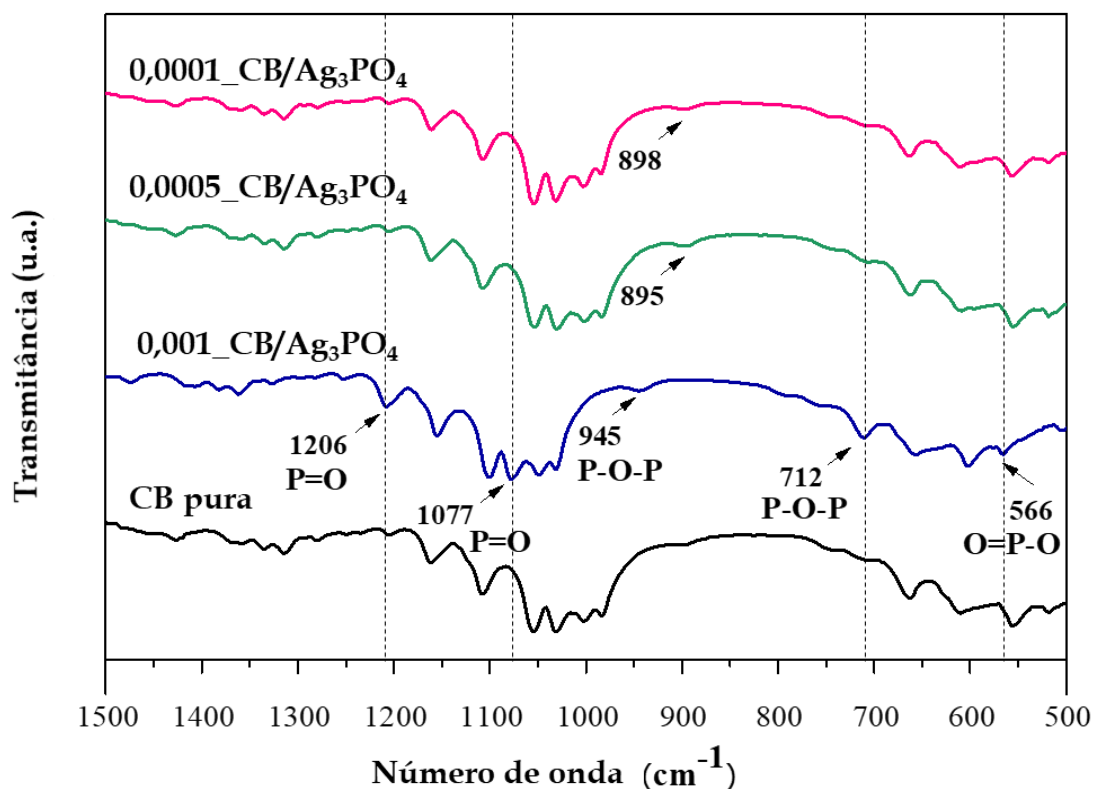


FIGURA 5.5 - Espectros de absorção na região de 1.500 a 500 cm^{-1} , da celulose bacteriana pura e dos filmes compósitos de $\text{CB}/\text{Ag}_3\text{PO}_4$.

A maior evidência da incorporação das partículas de Ag_3PO_4 nos filmes de CB é confirmada pelo surgimento das seguintes bandas de absorção na amostra do compósito $0,001_CB/\text{Ag}_3\text{PO}_4$, sintetizado com a maior concentração dos reagentes precursores de Ag_3PO_4 : (1) A banda de absorção, localizada em 1205 cm^{-1} correspondente a vibração de estiramento assimétrico da ligação $\text{P}=\text{O}$; (2) A banda de absorção em 1.076 cm^{-1} correspondente a vibração de estiramento assimétrico presente na ligação entre o $\text{P}-\text{O}-\text{P}$, após a associação entre o Ag_3PO_4 e a matriz de CB; (3) a banda de absorção em 946 cm^{-1} é atribuída ao estiramento assimétrico do modo $\text{P}-\text{O}-\text{P}$, presente no íon (PO_4^{3-}) ; (4) a banda de absorção localizada em 711 cm^{-1} atribuída à vibração de estiramento simétrico presente na molécula Ag_3PO_4 , referente às ligações entre $\text{P}-\text{O}-\text{P}$, decorrente da ligação $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{-CB}$ ¹⁷ e (5)

a banda de absorção em 566 cm^{-1} correspondente a deformação angular presente na ligação O=P-O, correspondente ao íon PO_4^{3-} (17,23,67-68,97). Nas amostras 0,0001_CB/ Ag_3PO_4 e 0,0005_CB/ Ag_3PO_4 , a associação entre o Ag_3PO_4 -CB, foi constatada a partir do aparecimento de um leve pico, por volta de 896 cm^{-1} , atribuído ao estiramento assimétrico presente na ligação P-O-P ¹⁷.

Para comprovar a presença das partículas de Ag_3PO_4 nos filmes de CB, o resíduo da amostra 0,001_CB/ Ag_3PO_4 foi analisado por FTIR (FIGURA 5.6). Para esta análise, a amostra 0,001_CB/ Ag_3PO_4 foi calcinada na mufla a 700°C . As partículas de Ag_3PO_4 foram sintetizadas pelo método de coprecipitação, empregando-se os reagentes precursores Na_2HPO_4 e AgNO_3 nas proporções molares 1:1. O espectro de absorção correspondente às partículas sintetizadas de Ag_3PO_4 apresenta dois picos intensos de absorção. O primeiro em 935 cm^{-1} correspondente a vibração de estiramento assimétrico da ligação P-O-P (18,19,69), e o segundo em 537 cm^{-1} correspondente a deformação angular da ligação O=P-O presente nos íons (PO_4^{3-}) (19,68). O espectro de absorção do resíduo sofreu um leve deslocamento para a esquerda, em relação ao espectro de absorção das partículas de Ag_3PO_4 . Notamos uma banda intensa e levemente alargada em 1020 cm^{-1} correspondente ao estiramento assimétrico presente na ligação P-O-P ⁶⁸. Pode-se notar o surgimento de uma banda de absorção em 797 cm^{-1} correspondente a vibração de estiramento da ligação P-O. Além disso, foi observada uma severa redução da banda em 537 cm^{-1} e seu deslocamento para 560 cm^{-1} .

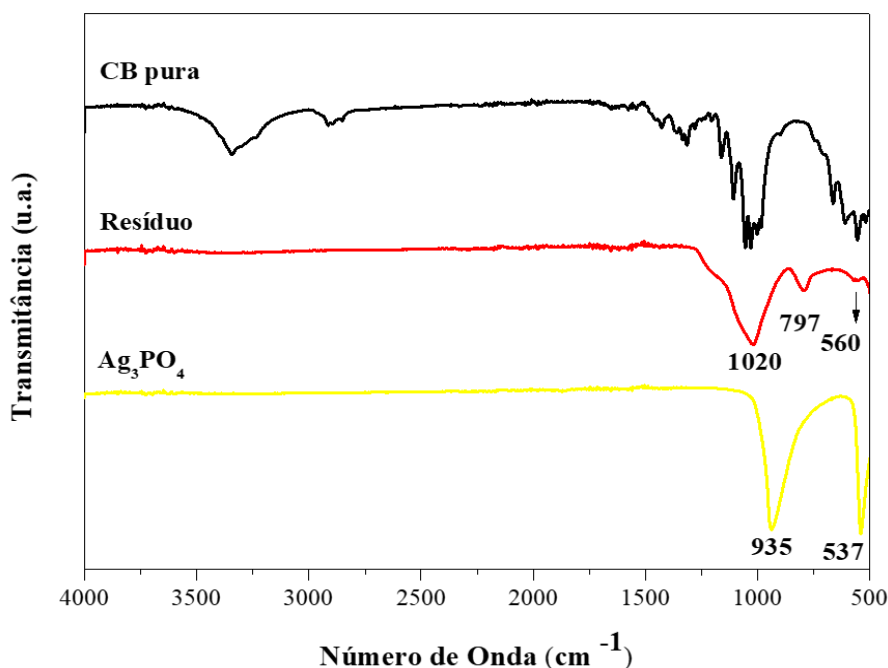


FIGURA 5.6 - Espectros de absorção na região de 4.000 a 500 cm^{-1} , correspondentes a CB Pura, ao resíduo de FTIR e as partículas de Ag_3PO_4 .

A CB é formada por fibras de tamanho nanométrico orientadas aleatoriamente e distribuídas formando estruturas com elevada porosidade, características que conferem a esse biopolímero elevada força de coesão, cristalinidade e estrutura compacta ³², como podemos observar na micrografia exibida na FIGURA 5.7. Além disso, esses poros podem favorecer a difusão e a inserção das partículas de Ag_3PO_4 no interior e sobre a superfície do biopolímero ³⁷. Características estruturais da celulose

bacteriana pura podem ser confirmadas pelas micrografias da superfície e da seção transversal do material apresentadas na FIGURA 5.7.

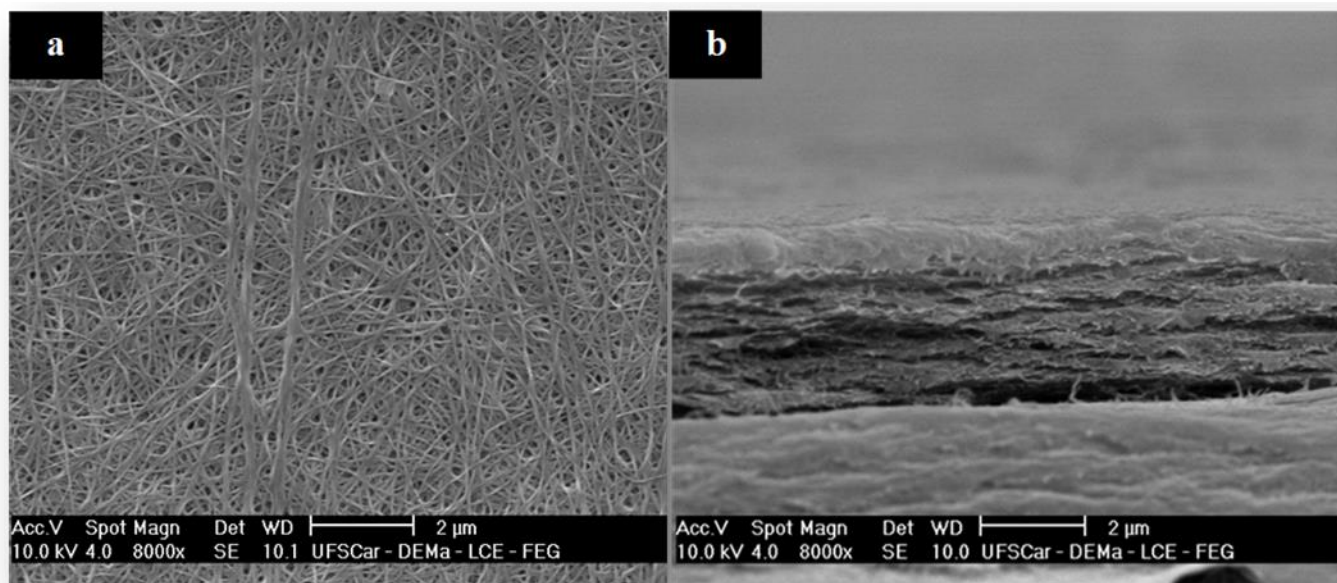


FIGURA 5.7 - Micrografias da superfície (a) e da seção transversal (b) dos filmes de celulose bacteriana pura.

As micrografias dos compósitos 0,0001_CB/Ag₃PO₄, 0,0005_CB/Ag₃PO₄ e 0,001_CB/Ag₃PO₄ (FIGURA 5.8), confirmam a presença de micropartículas dispersas e aglomerados distribuídos por toda a extensão da matriz polimérica. Ao aumentar a concentração dos reagentes na síntese de Ag₃PO₄, notamos um aumento na formação de aglomerados.

Para refinar as análises e obter uma visualização mais eficiente das partículas de fosfato de prata, foi utilizado um mapeamento por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS). As micrografias obtidas com EDS (FIGURA 5.9) confirmaram a presença dos elementos prata (Ag) e fósforo (P) nos filmes compósitos provenientes do Ag₃PO₄, indicando a incorporação desse material nos filmes de CB.

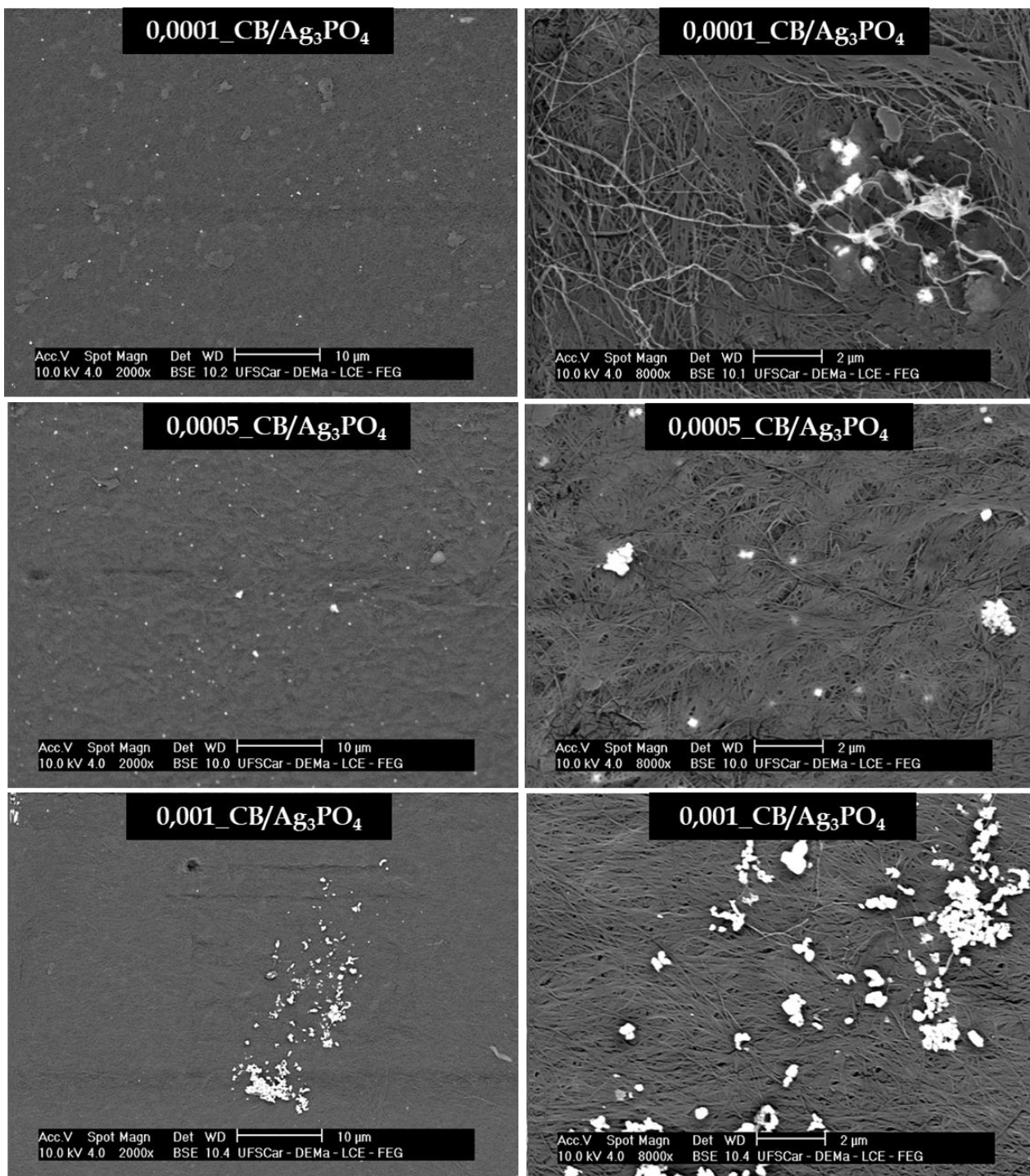


FIGURA 5.8 - Micrografias dos compósitos de CB/ Ag_3PO_4 obtidas em diferentes magnificações (2000x e 8000x).

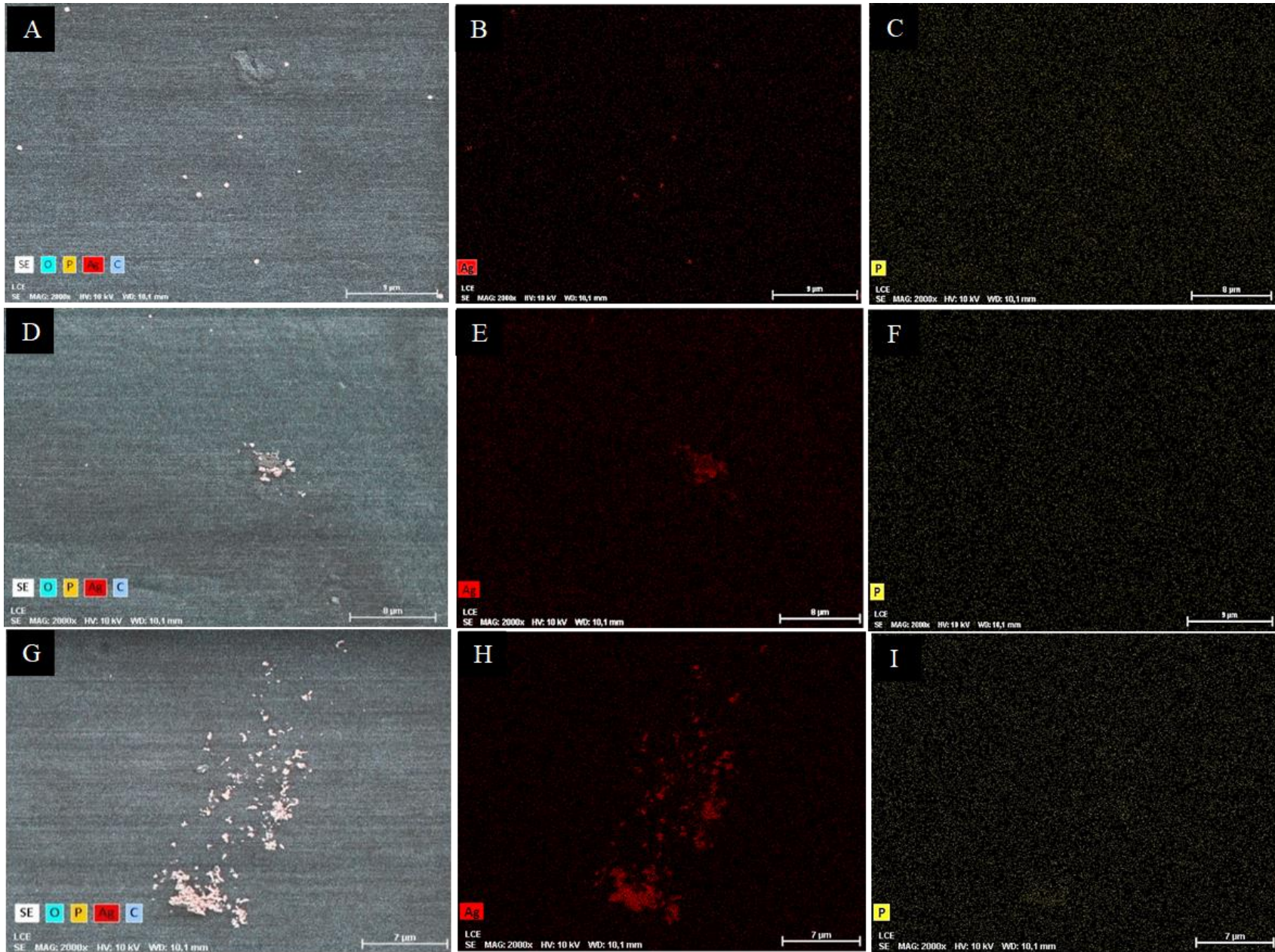


FIGURA 5.9 – Mapeamento por MEV-EDS dos compósitos (A) 0,0001_CB/Ag₃PO₄, (D) 0,0005_CB/Ag₃PO₄ e (G) 0,001_CB/Ag₃PO₄, (B), (E), (H): indicando a presença do elemento prata (Ag) e (C), (F), (I): indicando a presença do elemento fósforo (P).

Analisando as imagens da seção transversal (FIGURA 5.10), notamos a presença de partículas de Ag₃PO₄ aderidas nas lamelas da celulose bacteriana.

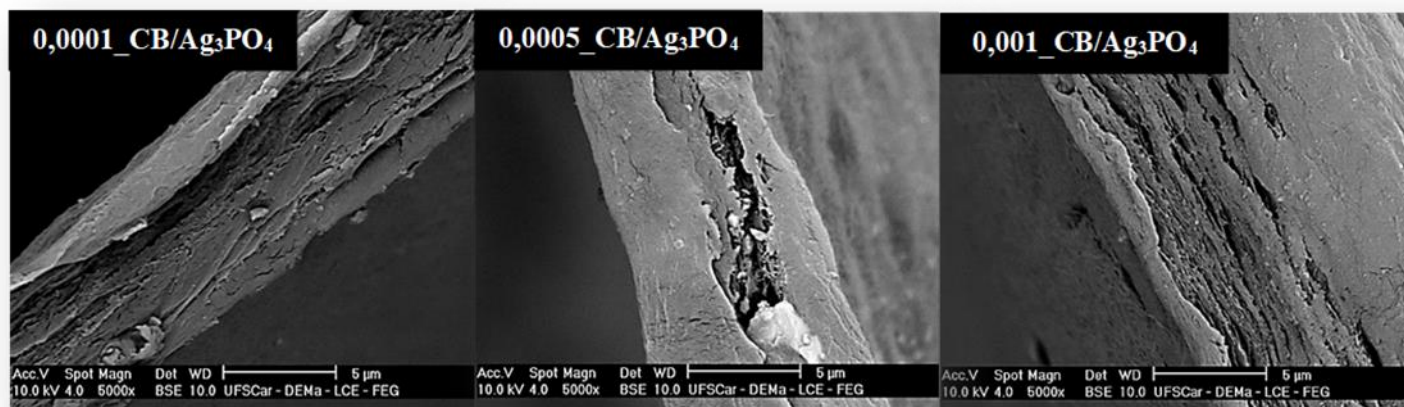


FIGURA 5.10 - Micrografias da seção transversal dos compósitos 0,0001_CB/Ag₃PO₄, 0,0005_CB/Ag₃PO₄ e 0,001_CB/Ag₃PO₄.

O tamanho médio das partículas foi medido com o auxílio do programa IMAJE J 1,53. Nas amostras dos filmes 0,0001_CB/Ag₃PO₄, onde as partículas foram sintetizadas em menores concentrações, de 1×10^{-4} mol·L⁻¹, o tamanho médio das partículas é equivalente a $0,566 \pm 0,054$ µm (≈ 566 nm). Já, as amostras 0,0005_CB/Ag₃PO₄, sintetizadas com concentrações de 5×10^{-4} mol·L⁻¹, apresentaram partículas com um tamanho médio menor, de aproximadamente $0,236 \pm 0,036$ µm (≈ 236 nm). Enquanto as partículas sintetizadas nas amostras 0,001_CB/Ag₃PO₄, de maior

concentração $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, apresentaram um tamanho médio semelhante as amostras dos filmes compósitos 0,0005_CB/Ag₃PO₄, de aproximadamente $0,228 \pm 0,023 \text{ } \mu\text{m}$ ($\approx 228 \text{ nm}$). As micropartículas formadas apresentaram uma tendência a diminuição de tamanho, com o aumento das concentrações utilizadas na síntese das partículas de Ag₃PO₄. Além disso, os micro cristais sintetizados apresentam morfologia cúbica, como pode-se observar pela micrografia apresentada na FIGURA 5.11.

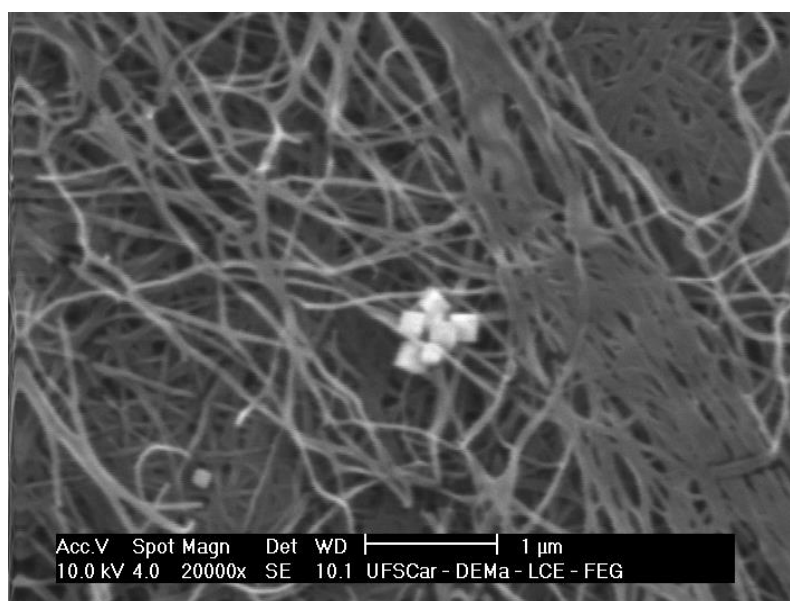


FIGURA 5.11. Micrografia da superfície do compósito 0,001_CB/Ag₃PO₄.

A análise de difratometria de raios X foi utilizada para avaliar as diferenças na estrutura cristalina dos filmes de CB pura após a incorporação das micropartículas de Ag₃PO₄. De acordo com os difratogramas (FIGURA 5.12) obtidos foi possível observar dois picos de difração, levemente alargados na amostra correspondente a CB pura, em $2\theta = 14,7^\circ$ e $22,8^\circ$, atribuídos aos alomorfos I α e I β da celulose nativa I correspondentes aos planos cristalográficos $(100)_{1\alpha}$, $(110)_{1\beta}$ e $(010)_{1\beta}$ em 15° e $(110)_{1\alpha}$ e $(200)_{1\beta}$ em $22,5^\circ$. Foi notado também, a presença de pequeno pico (ombro) por volta

de $17,0^\circ$ (010), também correspondente a celulose I ^(33,49,71-79,105). Além disso, os difratogramas também exibem as regiões amorfas da celulose bacteriana.

Os compósitos 0,0001_CB/Ag₃PO₄, 0,0005_CB/Ag₃PO₄ e 0,001_CB/Ag₃PO₄, apresentaram picos de difração, levemente deslocados em relação a celulose bacteriana pura, como pode ser visto na TABELA 5.1. Além disso, foi observado uma alteração na intensidade dos picos cristalinos, sendo que a amostra 0,0001 CB/Ag₃PO₄ apresentou uma redução acentuada na intensidade de seu pico de difração em $14,7^\circ$.

TABELA 5.1 – Picos de difração correspondentes a CB pura e aos compósitos de CB/Ag₃PO₄

Amostras	Plano de difração	Plano de difração	Plano de difração
	(110)	(010)	(200)
CB Pura	$14,7^\circ$	$17,0^\circ$	$22,8^\circ$
0,0001_CB/Ag ₃ PO ₄	$14,7^\circ$	$17,0^\circ$	$23,0^\circ$
0,0005_CB/Ag ₃ PO ₄	$14,5^\circ$	$16,8^\circ$	$22,8^\circ$
0,001_CB/Ag ₃ PO ₄	$14,3^\circ$	$16,6^\circ$	$22,8^\circ$

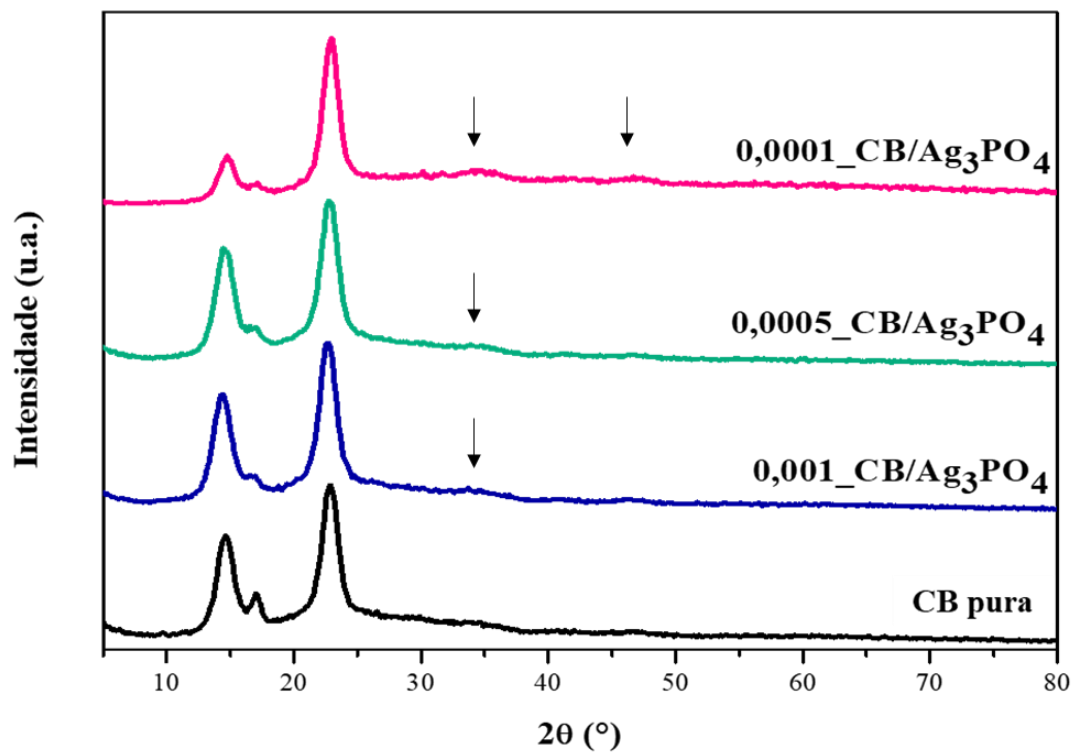


FIGURA 5.12 - Difratoogramas de raios X (DRX) dos filmes de celulose bacteriana pura (CB pura) e dos filmes compósitos (CB/Ag₃PO₄).

A partir dos difratogramas, foi possível realizar a análise de múltiplos picos e determinar o índice de cristalinidade (*CrI*) de cada amostra TABELA 5.2, através da relação entre a área dos picos cristalinos com a área das regiões amorfas, utilizando-se a equação 5.1:

$$CrI = \frac{A_c}{(A_c - A_a)} \times 100 \quad \text{Equação 5.1}$$

Onde A_c corresponde a área dos picos cristalinos e A_a representa a área dos halos amorfos.

TABELA 5.2 - Filmes de celulose bacteriana pura e dos compósitos de CB/Ag₃PO₄ com seus respectivos índices de cristalinidade.

Amostras	Índice de Cristalinidade (CrI)
CB Pura	86,0 %
0,0001_CB/Ag ₃ PO ₄	94,4 %
0,0005_CB/Ag ₃ PO ₄	93,0 %
0,001_CB/Ag ₃ PO ₄	93,7 %

A estrutura molecular da celulose bacteriana apresenta um elevado índice de cristalinidade (entre 45-92%), por ser abundantemente composta por grupos hidroxila e associada por uma extensa rede de ligações de hidrogênio, características que conferem a esse biopolímero, propriedades como, hidrofiliçidade, biodegradabilidade, etc ^(76,80,87). Após a inserção das partículas de Ag₃PO₄ na matriz polimérica de CB, notou-se um aumento no índice de cristalinidade de todos os filmes compósitos de CB/Ag₃PO₄. O aumento observado na cristalinidade desses materiais, pode ser atribuído a incorporação das micropartículas de Ag₃PO₄ e, sua associação com os grupos hidroxila, presentes nas fibras da CB resultando em uma pequena alteração na estrutura do biopolímero ^(70,86).

Segundo a literatura ^(18-23,46), o Ag₃PO₄ apresenta os principais picos de difração nas regiões $2\theta = 20,9^\circ, 29,7^\circ, 33,3^\circ$ e $36,7^\circ, 42,7^\circ, 52,9^\circ, 55,0^\circ, 57,5^\circ, 61,9^\circ$ e $63,9^\circ$ correspondentes aos planos cristalográficos (110), (200),

(210), (211), (310), (222), (320), (321), (400) de acordo com o JCPDS correspondente ao número 06-0505, atribuído a simetria cúbica (FIGURA 5.13). Nos difratogramas correspondentes as amostras dos compósitos, não foi observado picos de difração bem definidos atribuídos às partículas de Ag_3PO_4 , possivelmente devido a menor quantidade de material inorgânico presente no compósito, em comparação com a matriz polimérica de CB ^(86,98). Entretanto, foi observado um leve reflexo nas regiões de 29.9° e $34,6^\circ$ correspondentes às posições dos picos de difração do Ag_3PO_4 , com maior evidência no compósito 0,0001_CB/ Ag_3PO_4 , como foi indicado na (FIGURA 5.12).

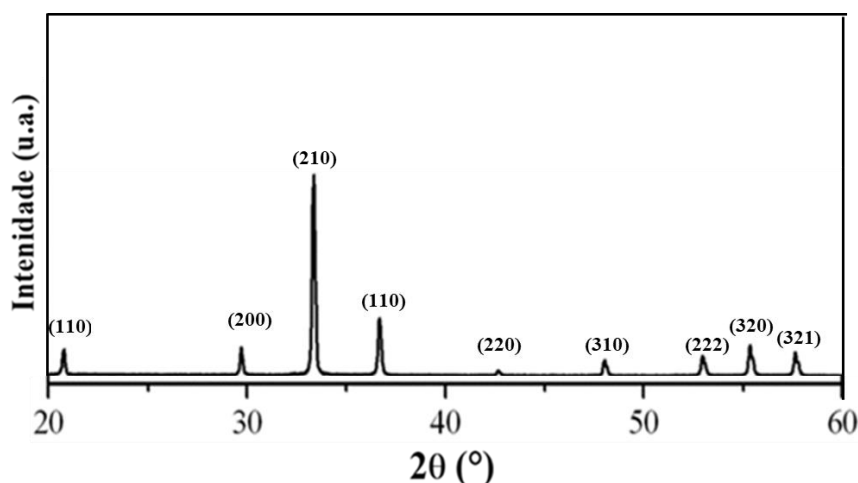


FIGURA 5.13 - Difratograma do Ag_3PO_4 e seus respectivos planos cristalográficos. Fonte: Adaptado ⁴⁶.

5.3) Análises Térmicas

Com o intuito de determinar o efeito da incorporação das diferentes concentrações de partículas de Ag_3PO_4 nas propriedades térmicas da celulose bacteriana, foram realizadas análises de calorimetria exploratória diferencial

(DSC) na amostra de CB pura e nos filmes compósitos de CB/Ag₃PO₄. As curvas de DSC podem ser observadas na FIGURA 5.13.

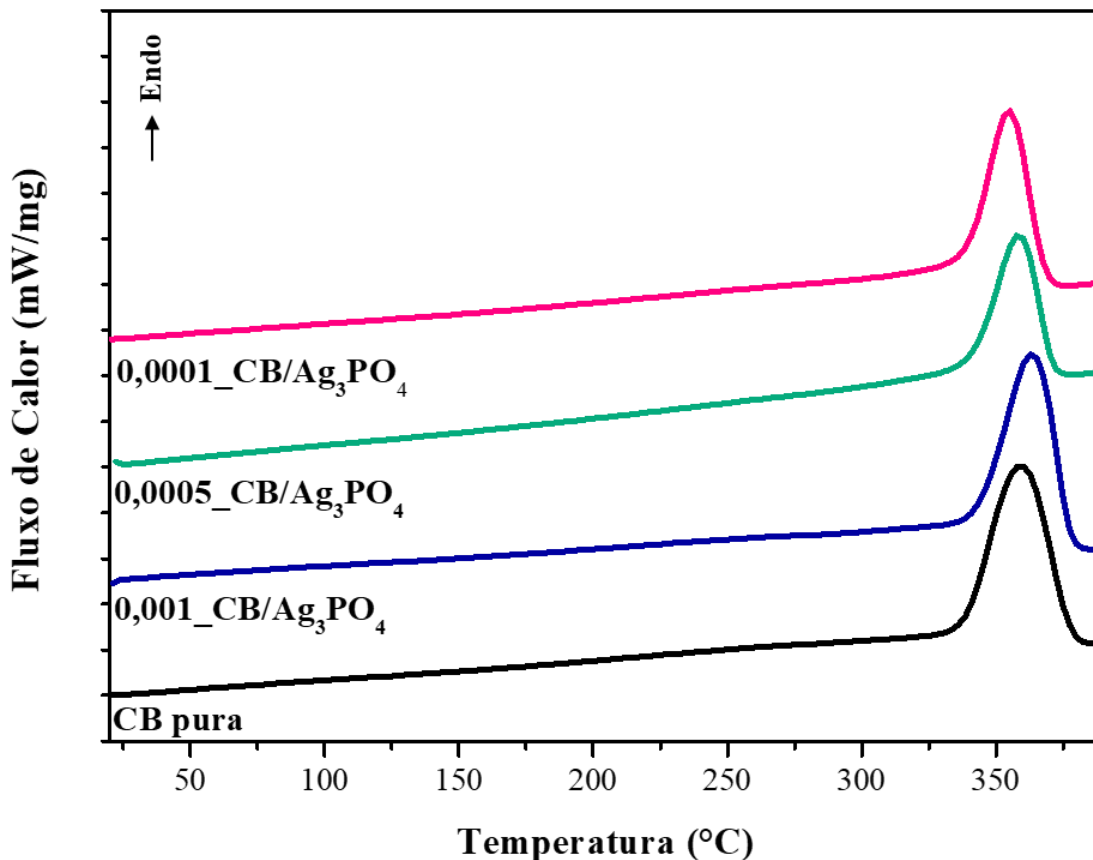


FIGURA 5.14 – Curvas de DSC dos filmes de celulose bacteriana pura e dos filmes compósitos de CB/Ag₃PO₄.

Os eventos endotérmicos em torno de 358°C e 362 °C, podem ser atribuídos a transição polimórfica da CB, seguida da fusão de suas regiões cristalinas ^(33,83). O perfil de curva da celulose bacteriana pura, apresenta temperatura de fusão (T_m) correspondente a $358,78 \pm 0,63$ °C. As amostras dos filmes compósitos 0,0001_ CB/Ag₃PO₄ e 0,0005_ CB/Ag₃PO₄, apresentaram uma pequena diminuição da T_m , porém esses valores estão dentro do desvio padrão quando comparados a CB pura. Enquanto a amostra

do compósito 0,001_ CB/Ag₃PO₄, apresentou um ligeiro aumento na temperatura da T_m correspondente a 362,87 ± 0,17. Entretanto esse valor não corresponde a uma diferença estatisticamente significativa em relação a CB pura.

TABELA 5.3 – Valores correspondentes a temperatura de fusão (T_m) da CB pura e dos compósitos de CB/Ag₃PO₄.

Amostras	Pico Endotérmico - T _m (°C)
CB Pura	358,78 ^{ab} ± 0,63
0,0001_ CB/Ag ₃ PO ₄	356,85 ^b ± 1,85
0,0005_ CB/Ag ₃ PO ₄	354,76 ^b ± 3,40
0,001_ CB/Ag ₃ PO ₄	362,87 ^a ± 0,17

* As médias com diferentes letras na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

A análise termogravimétrica foi realizada para avaliar a estabilidade térmica dos materiais compósitos sintetizados (CB/Ag₃PO₄) e compará-la com a celulose bacteriana pura, baseando-se na variação de perda de massa dos materiais em função da temperatura sob atmosfera oxidativa. As curvas termogravimétricas correspondentes aos filmes de CB pura e aos compósitos de CB/Ag₃PO₄ estão apresentadas na FIGURA 5.14. A temperatura inicial (T_i) considerada nesta análise foi a temperatura onde as amostras perdem 7% de sua massa inicial.

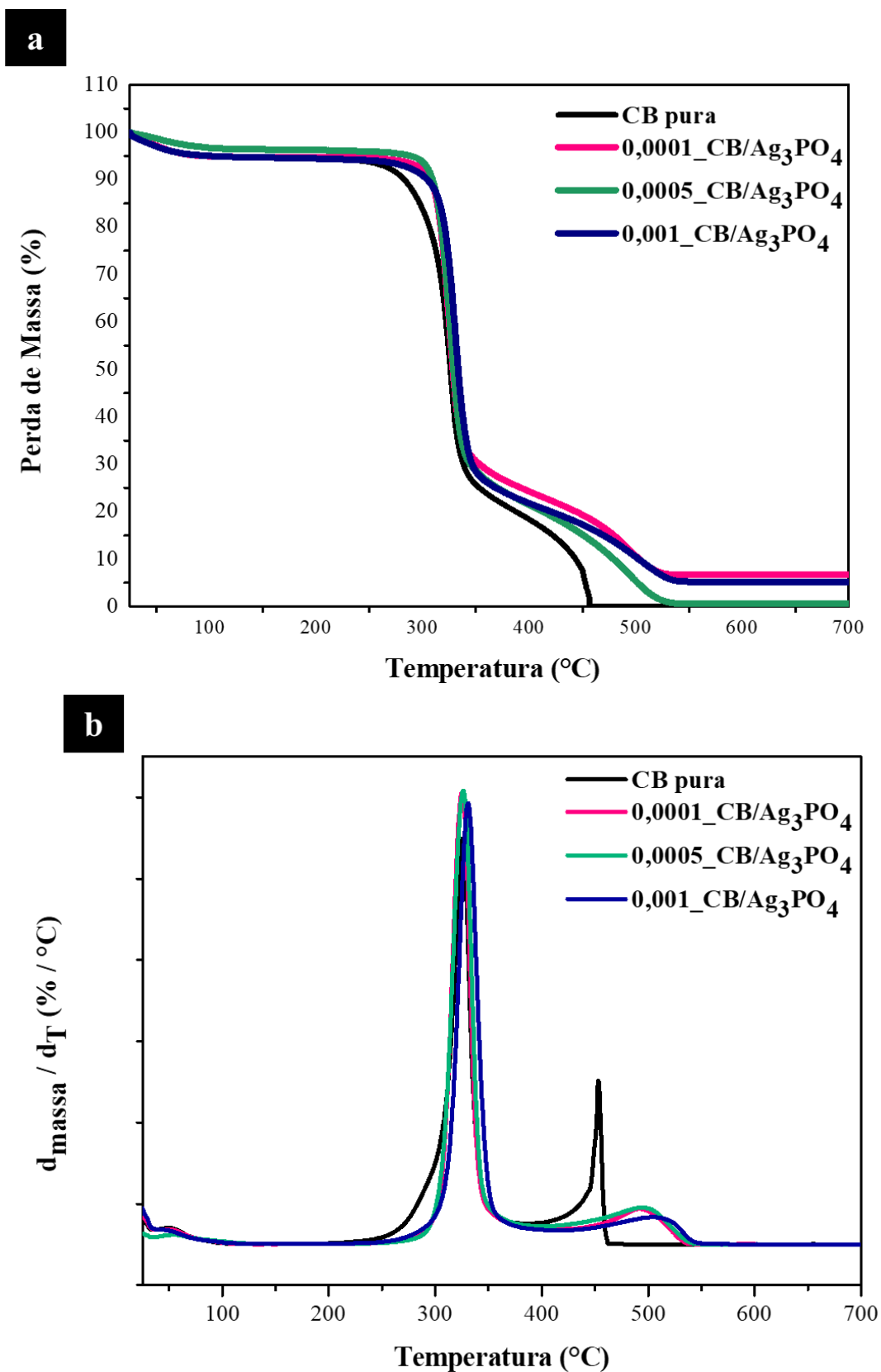


Figura 5.15 - Curvas de TG (a) e DTG (b) obtidas dos filmes de celulose bacteriana e dos compósitos de CB/Ag₃PO₄.

Na amostra dos filmes de CB pura, notamos a presença de três eventos de perda de massa. O primeiro evento, com perda de massa de 7%, tem início em 30 °C e término em 70 °C, correspondente à evaporação da água adsorvida na superfície do biopolímero. As curvas de TG apresentam um perfil típico esperado para materiais celulósicos, com temperatura de decomposição acima de 300 °C (7,12,33,40). O segundo evento de perda de massa, decorrente dos processos de despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas, tem início em 305 °C e término em 316° C, com perda de massa de 65%. E o terceiro, tem início em 450°C e término em 477°C, com perda de massa de 28% correspondente aos processos oxidativos, que incluem, o rompimento de resíduos carbonáceos e a formação de voláteis (80,83). Para a CB pura pode-se considerar que os três eventos consistem na decomposição completa do biopolímero, resultando em uma perda de massa de 100%.

Pode-se notar que os filmes compósitos de CB/Ag₃PO₄ exibem uma temperatura de início de degradação (T_i) mais elevada que a celulose bacteriana pura, sugerindo que a inserção das partículas de fosfato de prata dificultou a saída de voláteis, indicando um aumento na estabilidade térmica do biopolímero. Este dado está de acordo com os espectros de infravermelho (FTIR-ATR) onde são observadas interações entre a partícula e o polímero. Na TABELA 5.4, estão dispostos os dados obtidos a partir das curvas de TGA e DTG referentes às amostras de CB pura e dos compósitos de CB/Ag₃PO₄.

TABELA 5.4 – Dados obtidos por meio das curvas de TG e DTG

Amostra	T _i (97%) (°C)	T _{máx} (°C)	ΔT	Percentual Residual (%)
CB pura	305,06 ^c ± 3,06	326,92 ^a ± 1,92	21,89	0
0,0001_CB/Ag ₃ PO ₄	311,75 ^b ± 0,35	324,49 ^a ± 0,84	12,74	5,41 ± 1,40
0,0005_CB/Ag ₃ PO ₄	313,15 ^{ab} ± 0,55	325,61 ^a ± 0,66	12,46	1,12 ± 0,50
0,001_CB/Ag ₃ PO ₄	316,00 ^a ± 0,40	328,195 ^a ± 2,88	12,18	5,63 ± 0,45

* As médias com diferentes letras na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A temperatura de máxima velocidade de perda de massa (T_{máx}) dos compósitos de CB/Ag₃PO₄, determinada pelos valores de pico encontrados na DTG, não apresentaram uma diferença significativa em relação a CB pura. Analisando a cinética de perda de massa, podemos observar que o valor de ΔT foi reduzido para os materiais contendo Ag₃PO₄ indicando que a cinética de perda de massa acontece de maneira mais acelerada⁸¹. Como hipótese a esse comportamento, podemos levar em conta a diferença existente entre a capacidade calorífica da substância inorgânica (Ag₃PO₄) e do material orgânico (CB pura). Quando ocorre uma transferência de energia térmica para as partículas, elas são capazes de aquecer mais rapidamente que o material polimérico, favorecendo a aceleração dos processos de degradação das cadeias poliméricas⁶⁵.

Diferente da celulose bacteriana pura, os filmes compósitos apresentaram um percentual residual (TABELA 5.4), comprovadamente atribuído as partículas de Ag₃PO₄ inseridas na CB, como foi evidenciado na análise de FTIR-ATR da porção residual do compósito (FIGURA 5.6).

5.4) Ângulo de Contato (θ)

Alguns fatores, que incluem a topografia da região superficial de um material, sua microestrutura e suas propriedades adesivas, podem influenciar a biocompatibilidade dos materiais, pois eles determinam a capacidade das interações entre a interface do material e, as células, tecidos e outros componentes biológicos acontecerem de maneira mais favorável ⁸⁷. Por isso, intencionando uma aplicação biomédica, as medidas de ângulo de contato são essenciais para a investigação das propriedades de superfície dos materiais desenvolvidos.

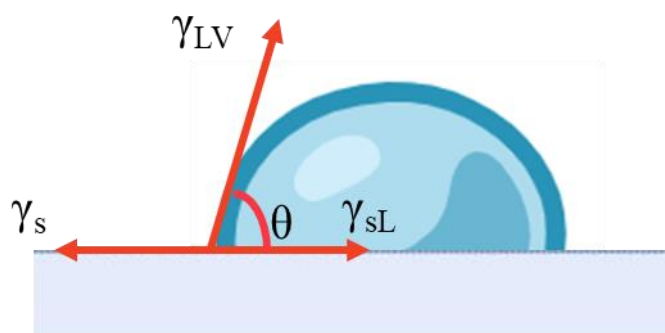


FIGURA 5.16 - Representação da medida de ângulo de contato (θ) entre uma superfície sólida e um líquido. Fonte: Criado pela autora através do site BioRender.com.

O ângulo de contato de uma gota em equilíbrio (FIGURA 5.15), pode ser determinado por meio da energia das seguintes interfaces: energia superficial do sólido (γ_s), energia superficial do líquido em equilíbrio com o vapor (γ_{LV}), energia interfacial do sólido com o líquido (γ_{SL}), associadas na equação de Young (Equação 5.1):

$$\gamma_s = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos(\theta) \quad (\text{Equação 5.1})$$

A equação de Dupré (Equação 5.2), relaciona o trabalho de adesão entre um sólido e um líquido (W_a):

$$W_a = \gamma_{LV} + \gamma_S - \gamma_{SL} \quad (\text{Equação 5.2})$$

E, a partir da combinação das equações (5.1) e (5.2), temos a equação de Young-Dupré:

$$W_a = \gamma_{LV} (\cos(\theta) + 1) \quad (\text{Equação 5.3})$$

Analisando os resultados das medidas de ângulo de contato (FIGURA 5.16), notou-se que quando em contato com uma gota de água (um líquido polar), a CB pura apresenta uma alta molhabilidade, com um ângulo de contato baixo, correspondente a $\theta = 36,26^\circ$, caracterizando-a como um material hidrofílico. A elevada energia superficial da celulose, está relacionada a presença dos grupos hidroxila (OH) associados por ligações de hidrogênio, distribuídos por toda a sua estrutura, configurando-a como um material altamente hidrofílico ^(83-84,87). O ângulo de contato formado entre a CB e o diiodometano foi $31,86^\circ$, coerente com os resultados apresentados na literatura ^(85,86).

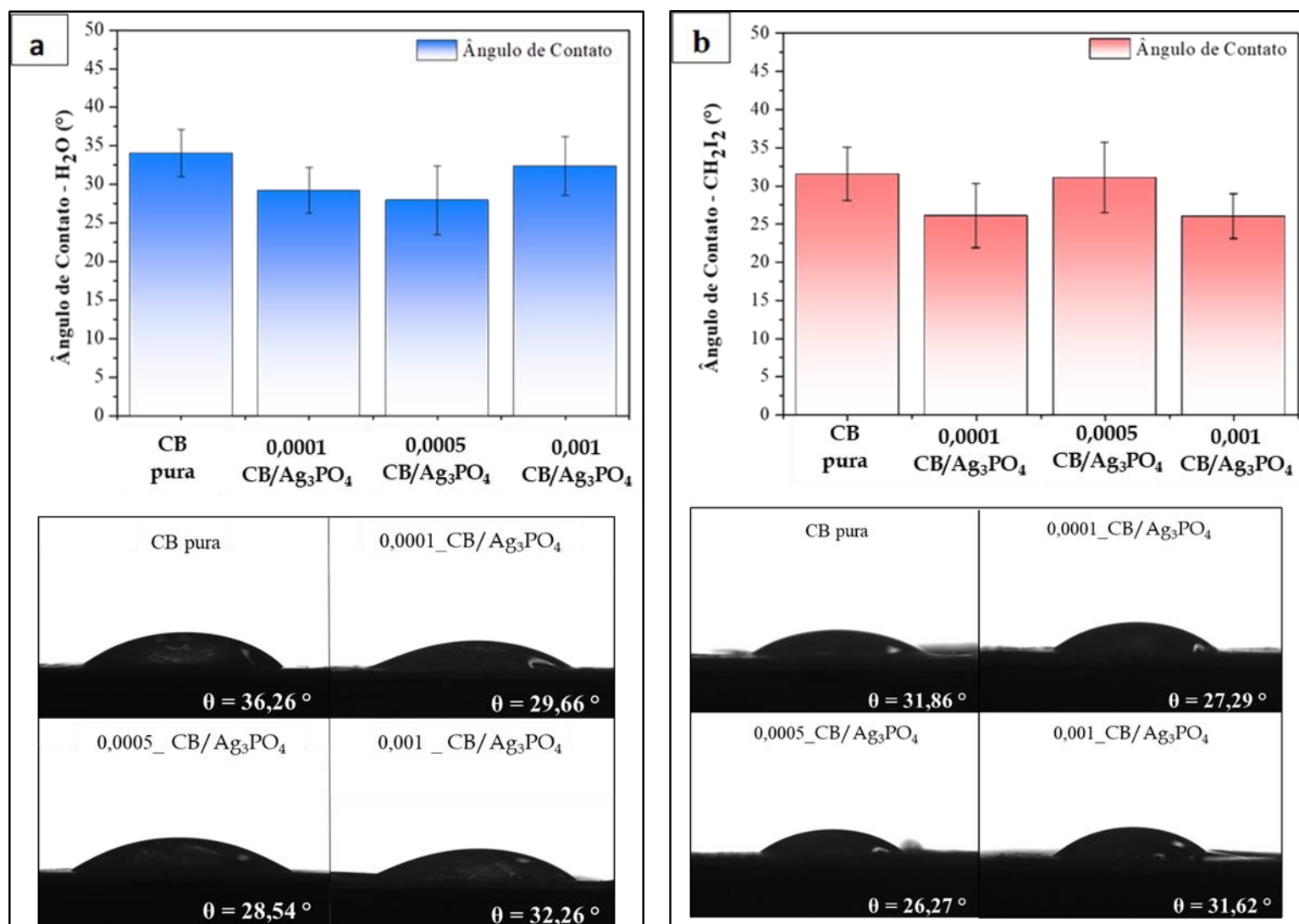


FIGURA 5.17 - Resultados das medidas de ângulo de contato, suas respectivas representações em diferentes líquidos (a: água – H₂O e, b: diiodometano – CH₂I₂) e os valores de ângulo de contato obtidos referentes a CB pura e aos compósitos de CB/Ag₃PO₄.

Foi observada uma diminuição na medida de ângulo de contato dos compósitos 0,0001_CB/Ag₃PO₄, 0,0005_CB/Ag₃PO₄, em relação a CB pura TABELA 5.5, demonstrando que esses compósitos se tornaram mais hidrofílicos após a inserção das partículas de Ag₃PO₄.

TABELA 5.5. Medidas de ângulo de contato da CB pura e dos compósitos de CB/Ag₃PO₄

Amostras	Ângulo de Contato – H₂O (°)	Ângulo de Contato – CH₂I₂ (°)
CB pura	36,26 ^a ± 1,24	31,86 ^a ± 0,67
CB/Ag₃PO₄_0,0001	29,66 ^{bc} ± 0,18	27,29 ^b ± 1,57
CB/Ag₃PO₄_0,0005	28,54 ^c ± 2,33	26,27 ^b ± 0,63
CB/Ag₃PO₄_0,001	32,26 ^{ab} ± 1,46	31,62 ^a ± 2,54

* As médias com diferentes letras na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

A presença das partículas de Ag₃PO₄ influenciaram nas características de molhabilidade do material, sendo que, nas amostras que apresentaram uma dispersão melhor dessas partículas (0,0001_CB/Ag₃PO₄, 0,0005_CB/Ag₃PO₄) o ângulo de contato medido foi menor em comparação com a CB pura, esses resultados são coerentes com as características mesoporosas da partícula¹⁹.

De acordo com FREDERICK FOWKES⁸⁷, a energia superficial poderia ser definida a partir da soma das contribuições das interações polares e dispersivas, conforme a Equação 5.4, abaixo:

$$\gamma = \gamma^P + \gamma^D \quad (\text{Equação 5.4})$$

Segundo FOWKES ⁸⁷, o trabalho de adesão está correlacionado apenas às interações dispersivas, como pode ser observado na (Equação 5.5):

$$W_a = 2 (\gamma_s^D \gamma_1^D)^{1/2} \quad (\text{Equação 5.5})$$

Associando as equações que representam o trabalho de adesão, Equação 5.3 e Equação 5.5, temos a seguinte igualdade:

$$\gamma_1 (\cos(\theta) + 1) = 2 (\gamma_s^D \gamma_1^D)^{1/2} \quad (\text{Equação 5.6})$$

A equação de FOWKES ⁸⁷, foi estendida por OWENS e WENDT ⁹⁵, que consideraram não apenas as interações dispersivas, mas também, as interações polares, resultando na Equação 5.7:

$$W_a = 2 (\gamma_s^D \gamma_1^D)^{1/2} + 2 (\gamma_s^P \gamma_1^P)^{1/2} \quad (\text{Equação 5.7})$$

Finalmente, SOUHENG WU ⁹⁴, baseando-se em média harmônica, determinou uma equação para realizar o cálculo aproximado da tensão superficial de superfícies poliméricas (Equação 5.8):

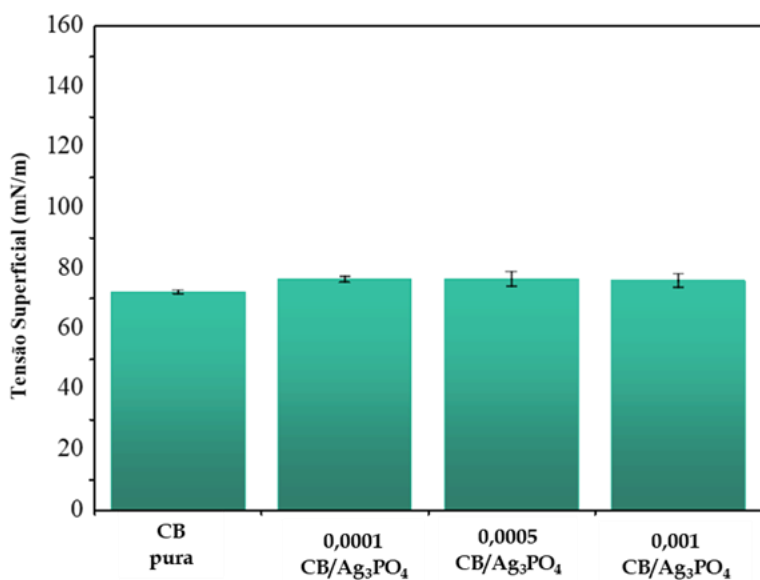
$$\gamma_1 (\cos(\theta) + 1) = \frac{4\gamma_s^D \gamma_1^D}{(\gamma_s^D + \gamma_1^D)} + \frac{4\gamma_s^P \gamma_1^P}{(\gamma_s^P + \gamma_1^P)} \quad (\text{EQUAÇÃO 5.8})$$

A tensão superficial (γ^{Total}) dos filmes compósitos de CB/Ag₃PO₄, bem como suas componentes polares (γ^{P}) e dispersivas (γ^{D}) (FIGURA 5.17) foram determinadas com base na equação de SOUHENG WU (Equação 5.8), empregando-se os valores tabelados (TABELA 5.6) de tensão superficial (γ_1) e das componentes polares (γ_1^{P}) e dispersivas (γ_1^{D}) dos líquidos sonda.

TABELA 5.6 - Valores tabelados correspondentes a tensão superficial e as componentes dispersivas e polares da água e do diiodometano

Líquido Sonda	γ_1 (mN/m)	γ_1^{P} (mN/m)	γ_1^{D} (mN/m)
H ₂ O	72,8	51,0	21,8
CH ₂ I ₂	50,8	50,8	0

a



b

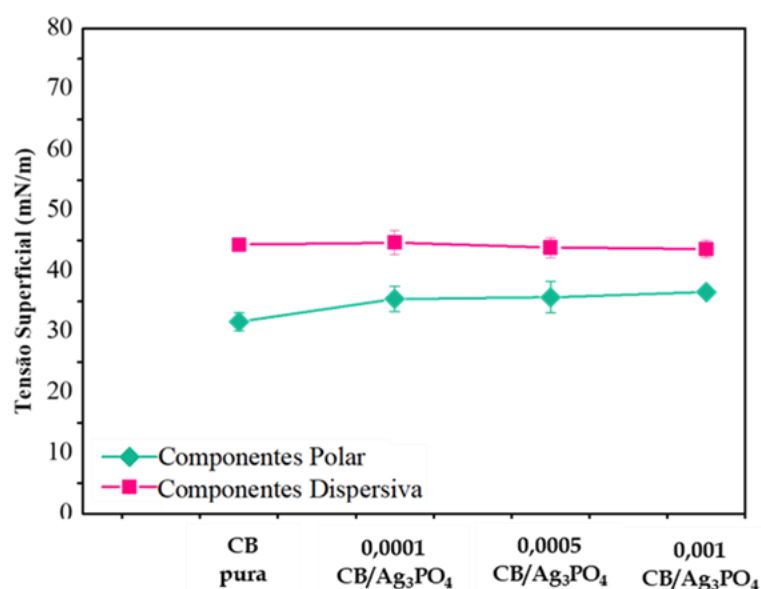


FIGURA 5.18 – Representação gráfica da (a) Tensão Superficial e suas (b) Componentes Polar e Dispersiva

As medidas de tensão superficial apresentaram uma tendência a aumentar com a incorporação das partículas de Ag_3PO_4 , sugerindo a ocorrência de um ligeiro aumento na energia superficial do biopolímero. Com a inserção das partículas de Ag_3PO_4 , foi observado um aumento da componente polar. No entanto, a componente dispersiva permaneceu praticamente inalterada. Sugerindo que o aumento da tensão superficial, pode ser atribuído ao incremento da componente polar, ocasionada pela presença das partículas de Ag_3PO_4 nos compósitos.

5.5) Avaliação da Citotoxicidade Celular

Para viabilizar a segurança filmes compósitos em suas aplicações futuras, foi realizado o teste de citotoxicidade celular baseado na ISO 10993-12⁹⁹ que descreve métodos para a avaliação da citotoxicidade in vitro de dispositivos médicos e estabelecer os níveis de toxicidade dos materiais sintetizados. A ISO 10993-5¹⁰⁰ determina que a viabilidade celular dos materiais testados deve ser superior a 70% para que eles sejam considerados atóxicos e seguros. Para esta análise, foram escolhidas duas amostras sintetizadas nas concentrações extremas: 0,0001_CB/ Ag_3PO_4 e 0,001_CB/ Ag_3PO_4 . As análises foram realizadas nos filmes antes (A) e após (B) a lavagem em banho ultrassônico para obtermos um parâmetro em relação a estabilidade das partículas incorporadas a esse material.

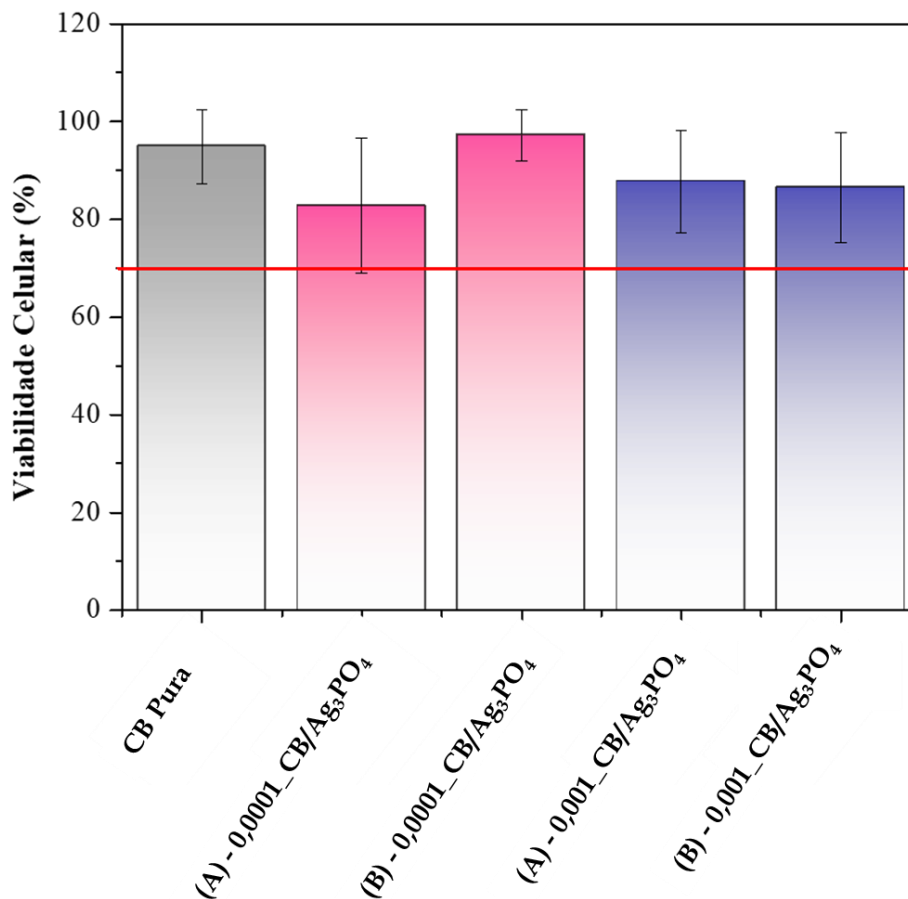


Figura 5.19 - Viabilidade Celular dos filmes de CB e dos filmes de CB/Ag₃PO₄

De acordo com os resultados obtidos, foi possível constatar que os filmes de CB pura e os filmes compósitos não apresentaram toxicidade para as células L929, com a manutenção da viabilidade celular acima de 70%, em todas as amostras testadas.

5.6) Avaliação dos Filmes Compósitos de CB/Ag₃PO₄ após o Tratamento a Plasma

O plasma *etching* de oxigênio (O₂) pode gerar modificações físicas e químicas na superfície dos materiais poliméricos influenciando na alteração

de suas características superficiais, tais como, hidroflicidade, morfologia, força iônica e biocompatibilidade ^(14,15).

A morfologia da superfície das amostras dos filmes de celulose bacteriana e dos compósitos de CB/Ag₃PO₄, sem e com tratamento a plasma de O₂, foi analisada por microscopia de força atômica (AFM) (FIGURAS 5.19 e 5.20). A amostra de celulose bacteriana pura apresentou uma rugosidade quadrática média de 30 de nm, antes do tratamento a plasma (FIGURA 5.19 e 5.20 – a). Após exposição ao plasma durante 2,5 minutos, foi observado o aparecimento de pequenas erosões nas fibras FIGURA 5.19 e 5.20 – b, ocasionando um aumento da rugosidade de sua superfície correspondente a 55 nm.

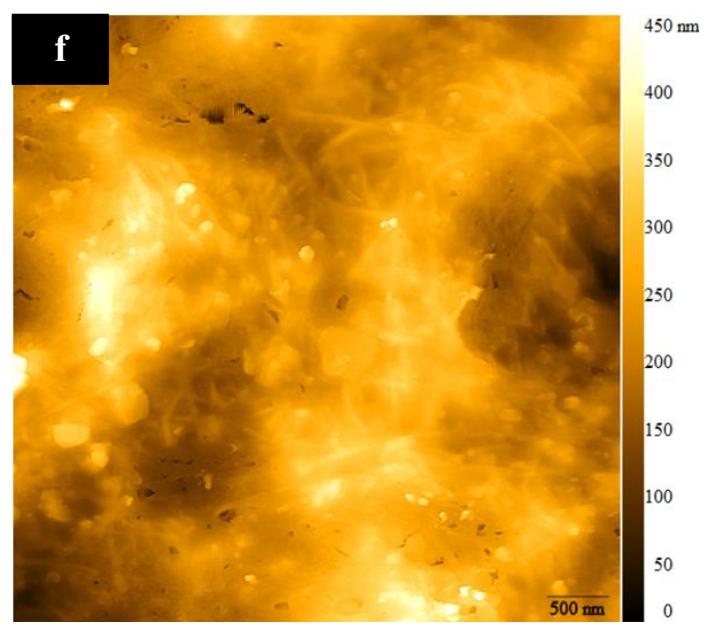
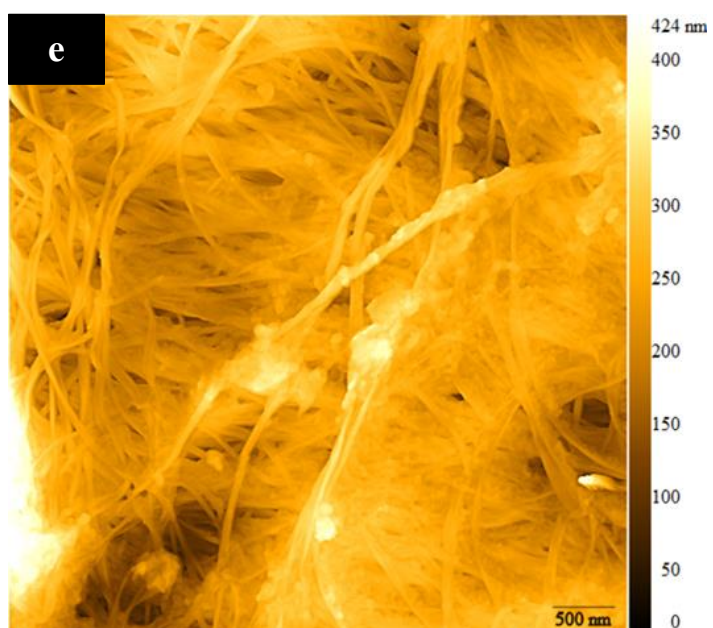
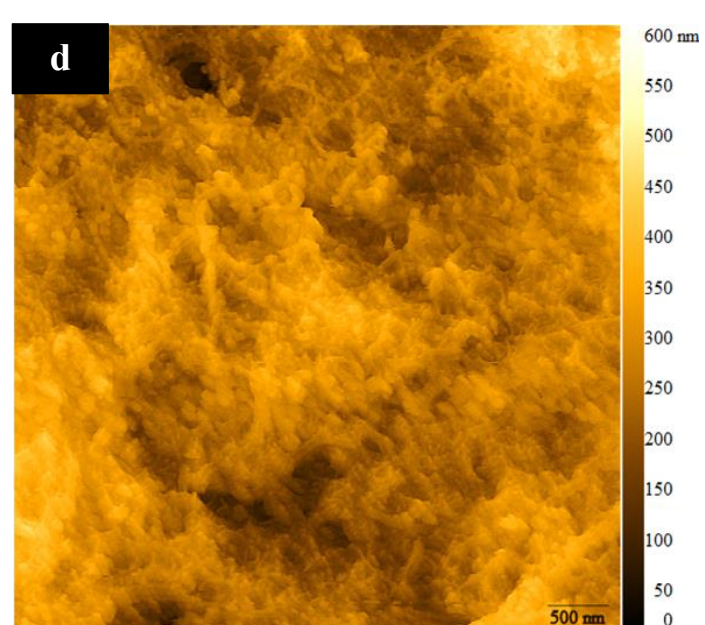
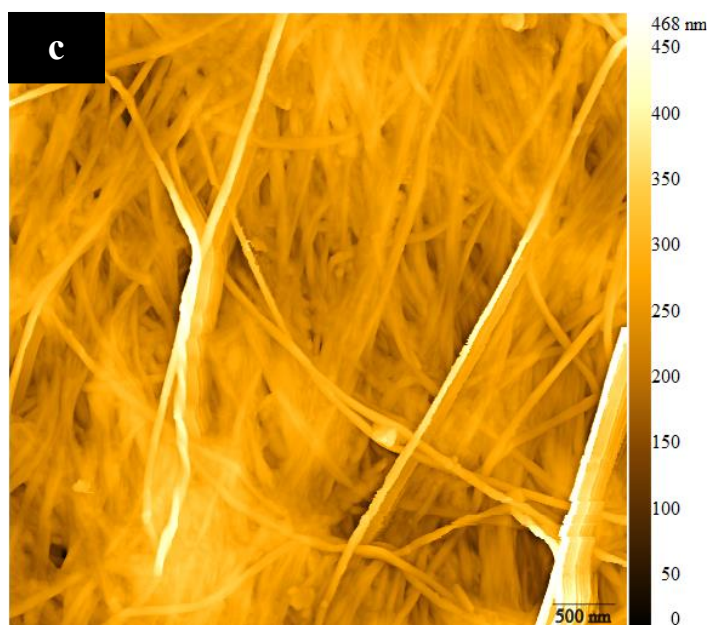
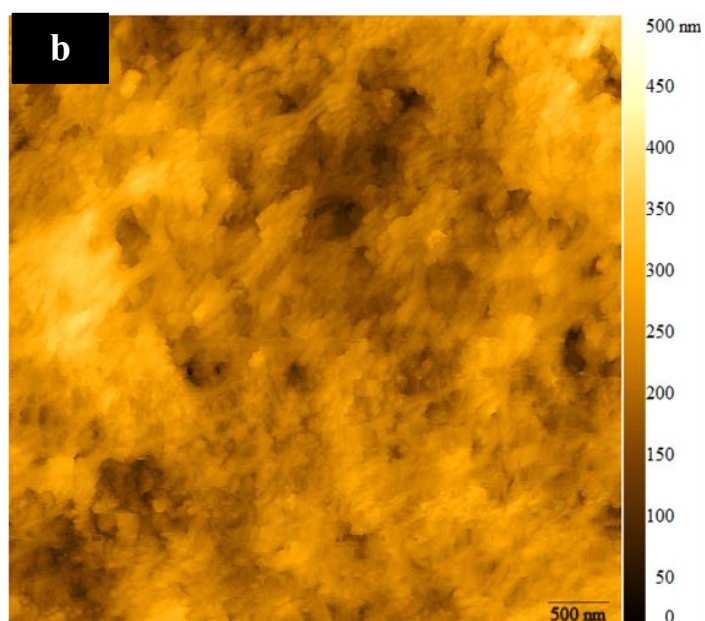
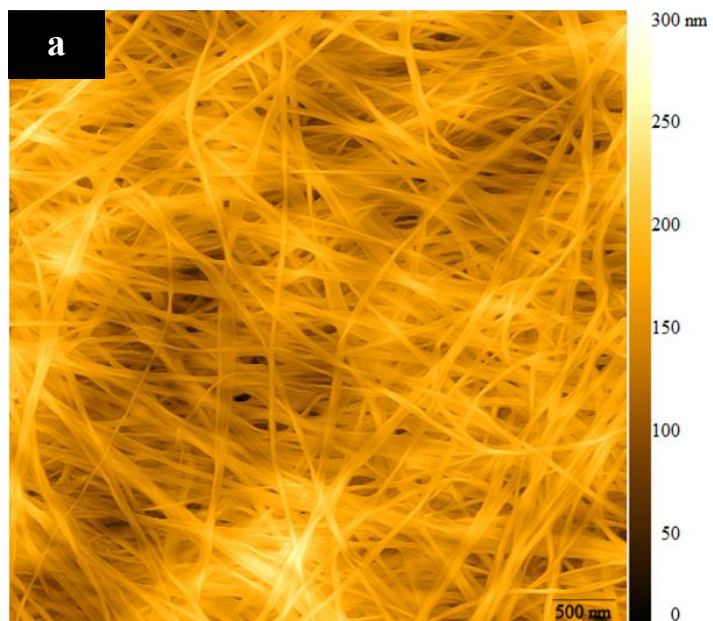


FIGURA 5.20 - Micrografias de AFM das amostras de CB pura antes (a) e após (b) o tratamento a plasma; dos compósitos (c) 0,0001_CB/Ag₃PO₄ e (d) 0,001_CB/Ag₃PO₄ (d) antes e após o tratamento a plasma (e) 1P-2,5 min (f) 2P-2,5 min.

Essas alterações topográficas também foram relatadas por KURNIAWAN et al.¹⁴, BENEVUTO et al.²⁹, LEAL et al.⁹⁰ ao realizarem o tratamento com plasma *etching*, utilizando-se gás oxigênio, em amostras de celulose bacteriana, durante 1, 2,5, 5 e 15 minutos. O plasma *etching* de oxigênio, é capaz de modificar a superfície de materiais celulósicos, devido a geração de espécies reativas (íons, radicais, elétrons, etc.), que além de uma possível funcionalização, podem resultar em efeitos de decomposição parcial das cadeias poliméricas, reorganizações e mudanças estruturais que refletem nas alterações na rugosidade do material^(89,91-92).

Nas imagens de AFM dos filmes compósitos (FIGURA 5.19 e 5.20 – c, d, e, f), é possível observar a presença partículas aderidas as fibras da CB, que contribuem com as imagens de MEV e confirmam a inserção de partículas de Ag₃PO₄ nos filmes de CB. No compósito 0,0001_CB/Ag₃PO₄ (FIGURA 5.19 e 5.20 – c) é possível notar uma distribuição mais homogênea da substância inorgânica, enquanto no compósito 0,001_CB/Ag₃PO₄ (FIGURA 5.19 e 5.20 – d), observa-se a presença de aglomerados, corroborando com as imagens de MEV (FIGURA 5.8), que demonstram as diferenças entre os materiais obtidos empregando-se diferentes concentrações, dos reagentes de partida, durante a síntese “*in situ*” dos compósitos de CB/Ag₃PO₄. Notou-se que a presença das partículas de Ag₃PO₄, resultou no aumento da rugosidade da CB, as amostras dos compósitos 0,0001_CB/Ag₃PO₄ e 0,001_CB/Ag₃PO₄ apresentaram rugosidade quadrática média correspondente a 53 nm e 50 nm, respectivamente.

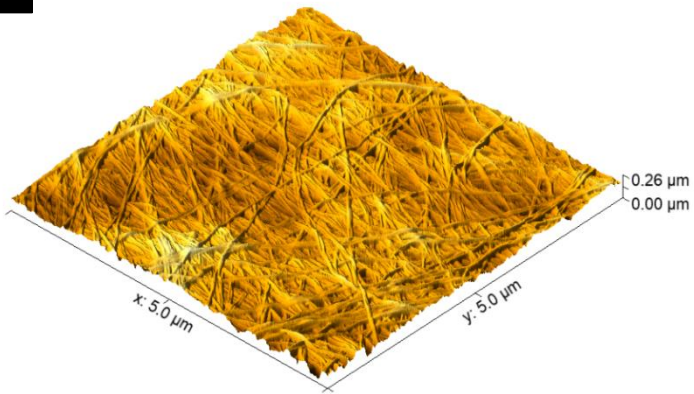
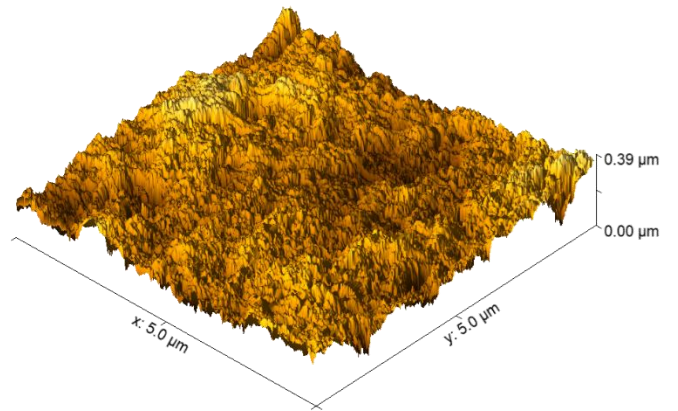
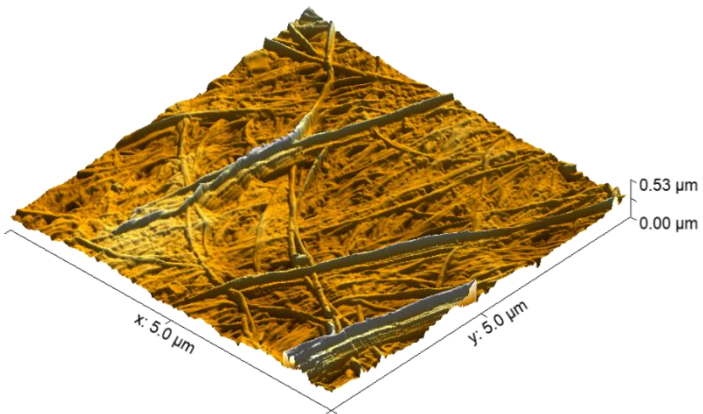
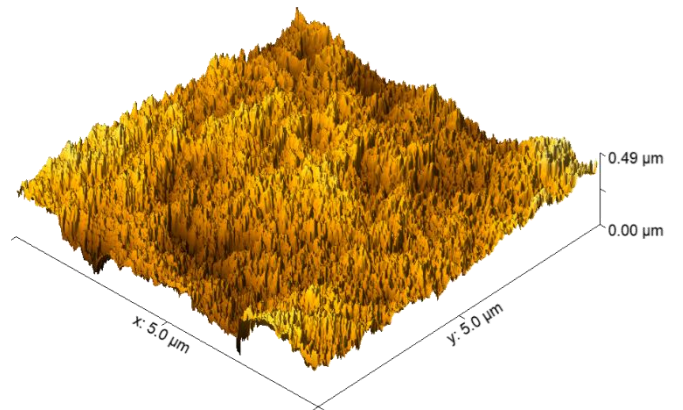
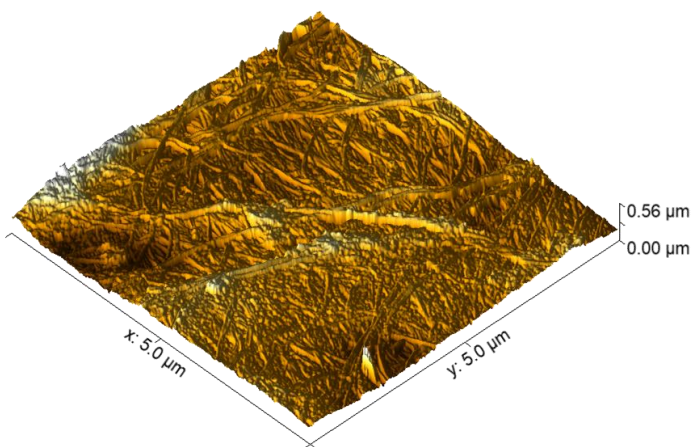
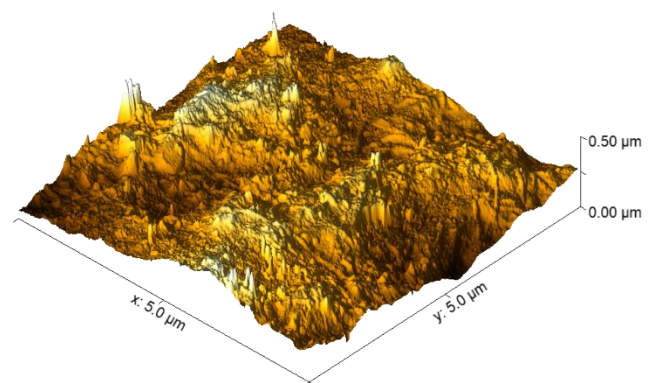
a**b****c****d****e****f**

FIGURA 5.21 – Micrografias em 2 D de AFM das amostras de CB pura antes (a) e após (b) o tratamento a plasma; dos compósitos (c) 0,0001_CB/Ag₃PO₄ e (d) 0,001_CB/Ag₃PO₄ (d) antes e após o tratamento a plasma (e) 1P-2,5 min (f) 2P-2,5 min.

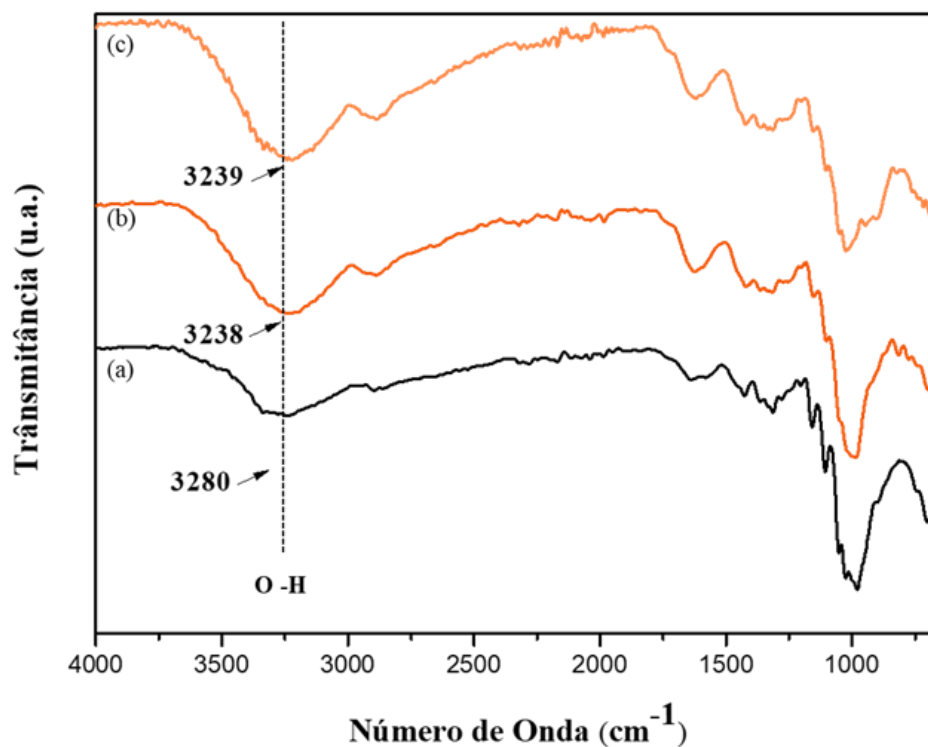


FIGURA 5.22 – Espectros normalizados de FTIR-ATR para as amostras dos filmes de (a) CB pura antes e após o tratamento por plasma de oxigênio: (b) CBP-2,5 min e (c) CBP-5 min.

As bandas características da celulose bacteriana obtidas através dos espectros de FTIR, puderam ser identificadas nas seguintes regiões de transmitância: (1) 3500 – 3000 cm^{-1} correspondentes a vibração de estiramento assimétrico, atribuída ao grupo O-H; (2) 2902-2892 cm^{-1} associada às vibrações de estiramento simétrico, entre C-H, e ao estiramento assimétrico da ligação entre H-C-H; (3) 1645 – 1614 cm^{-1} correspondentes a deformação angular presente na ligação entre H-O-H, que corresponde a

água adsorvida ao material e (4) aproximadamente 1056 cm^{-1} , atribuída a vibração de estiramento simétrico da ligação entre C-O.

Analisando os espectros de infravermelho dos filmes de celulose bacteriana pura após o tratamento a plasma de oxigênio, foi observado que a banda de absorção correspondente ao grupo hidroxila (O-H), tornou-se mais definida e sofreu um leve deslocamento para a direita, onde seu número de onda passou de 3280 cm^{-1} , na amostra de celulose bacteriana pura, para aproximadamente 3239 cm^{-1} nas amostras de CB pura após a exposição ao plasma de oxigênio durante 2,5 e 5 minutos (CBP – 2,5 min e CBP – 5,0 min). Esse deslocamento das bandas de absorção correspondentes ao grupo hidroxila, pode sugerir um aumento dos grupos OH presentes na estrutura superficial da celulose bacteriana, como foi observado por BHANTHUMNAVIN, et al. ²⁹ ao expor os filmes de celulose bacteriana durante 3 minutos, variando-se a pressão em 0,1 e 1,0 Torr, e durante 1 minuto a uma pressão de 1,0 Torr.

Após a exposição ao plasma de oxigênio, os espectros dos compósitos de 1P-2,5 min e 1P-5 min, foram levemente deslocados para a direita. A banda de absorção correspondente ao grupo hidroxila (O-H) sofreu um deslocamento para números de onda menores, de 3292 a 3238 cm^{-1} , em comparação ao compósito 0,0001_CB/Ag₃PO₄. No entanto, na amostra 0,001_CB/Ag₃PO₄, esse deslocamento foi mais pronunciado no compósito tratado durante 2,5 minutos (2P-2,5 min). Possivelmente, um aumento no tempo de exposição pode resultar num aumento do efeito *etching*, ocasionando a formação de voláteis de maneira mais acentuada, devido a presença das partículas de Ag₃PO₄ na matriz da CB, ocasionando um deslocamento menos pronunciado nos espectros das amostras tratadas a plasma durante 5 minutos, como pode-se observar o espectro de FTIR da amostra 2P-5 min ^(29,89,99).

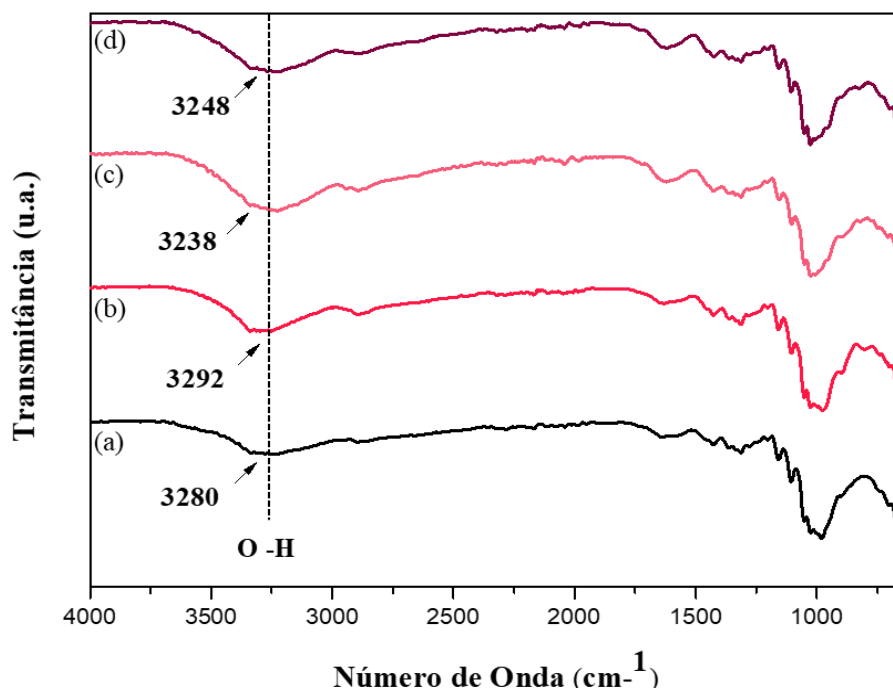


FIGURA 5.23 – Espectros normalizados de FTIR-ATR para as amostras do filme de CB Pura (a) e do compósito de 0,0001_CB/ Ag_3PO_4 antes (b) e após tratamento por plasma de oxigênio 1P - 2,5 min (c) e 1P - 5 min (d).

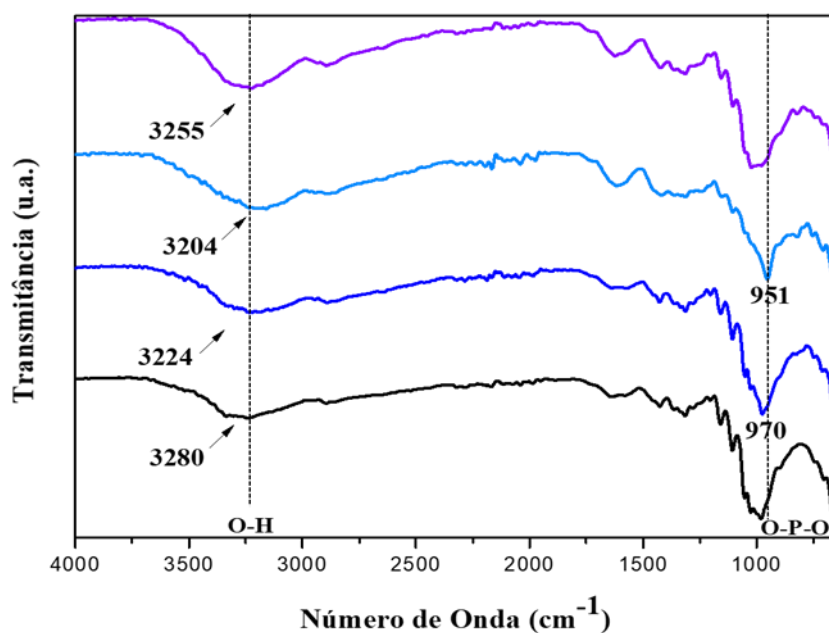


FIGURA 5.24 – Espectros normalizados de FTIR-ATR para as amostras do filme de CB Pura (a) e do compósito de 0,001_CB/Ag₃PO₄ antes (b) e após o tratamento por plasma de oxigênio 2P – 2,5 min (c) e 2P - 5 min (d).

Ademais, no espectro da amostra 2P – 2,5 min (FIGURA 5.23) foi observado o aparecimento uma pequena banda de absorção bem definida, em 951 cm⁻¹, correspondentes a ligação entre o P-O presente na molécula de Ag₃PO₄, sugerindo que o tratamento a plasma de oxigênio foi capaz de expor as partículas de Ag₃PO₄ presentes no filme compósito, corroborando com as micrografias de AFM, que evidenciaram a presença de partículas mais aparentes na superfície do compósito (FIGURAS 5.19 e 5.20 – d).

Nas amostras de CB pura (CBP-2,5 e CBP-5 minutos) e dos filmes dos compósitos de CB/Ag₃PO₄ modificados pela exposição ao plasma de oxigênio, foi verificado por meio das medidas de ângulo de contato, que os materiais apresentaram um grande aumento de sua molhabilidade. Quando a gota de água entrou em contato com a superfície dessas amostras, o líquido se espalhou rapidamente, após aproximadamente 3 segundos, promovendo um equilíbrio termodinâmico na interface do biopolímero e do líquido, que impossibilitou a medida de ângulo de contato. As medidas de ângulo de contato com diiodometano (FIGURA 5.24) também foram reduzidas nas amostras tratadas pelo plasma durante 2,5 minutos.



FIGURA 5.25. Representação do ângulo de contato obtido em : diiodometano correspondentes a amostra de celulose bacteriana pura CBP -2,5 min , e aos compósitos 1P – 2,5 min e 2P – 2,5 min.

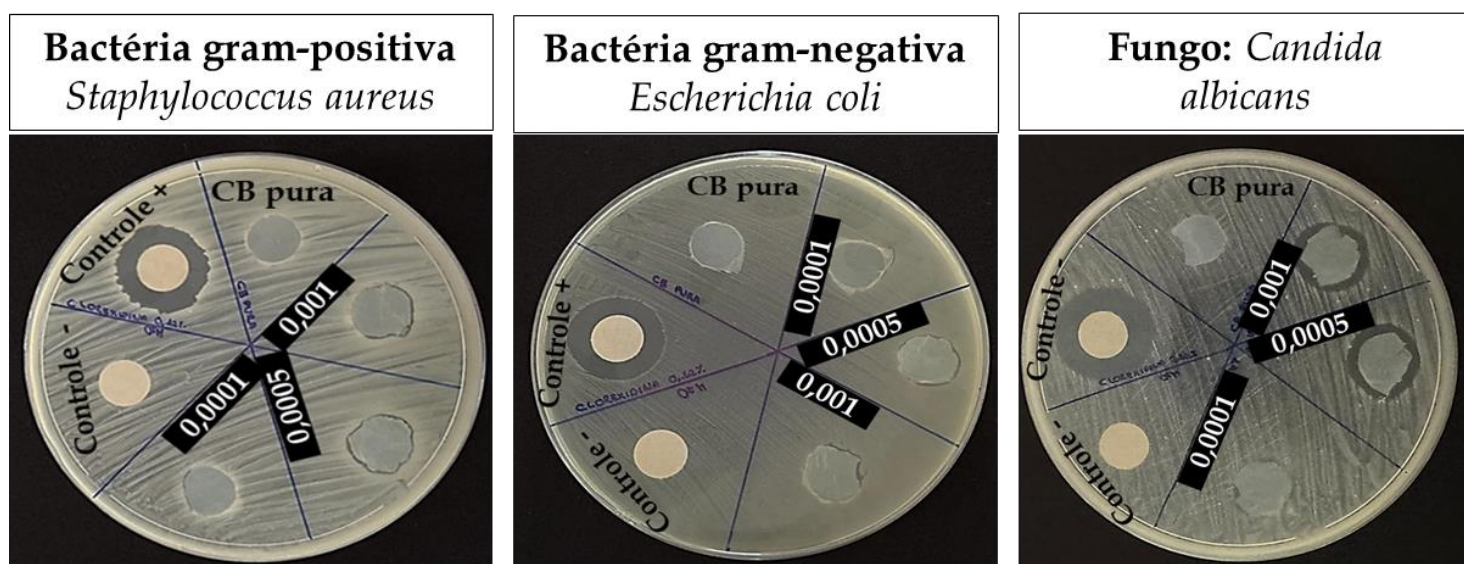
Como foi evidenciado pelas micrografias de AFM, dos compósitos 1P-2,5 min, 2P-2,5 min (FIGURA 5.19 e 5.20 d), o tratamento a plasma aumentou a rugosidade dos compósitos, além disso, as partículas de Ag_3PO_4 encontram-se em regiões mais superficiais. Portanto, a elevada energia de superfície das partículas, associada às suas características mesoporosas e, o aumento da rugosidade dos compósitos, possivelmente contribuem para um aumento na hidrofiliabilidade desses materiais. Esses resultados corroboram com as análises de FTIR, que sugerem que o tratamento a plasma ocasionou o aumento dos grupos polares no material polimérico.

A modificação por plasma de O_2 , realizada por KURNIAWAN et al.¹⁴, em filmes de celulose, a uma pressão de 0,1 Torr a 20W durante 1 minuto, resultou na obtenção de um material mais hidrofílico, com o declínio do ângulo de contato das amostras, que passou de 30° para 12° . Os resultados das medidas de ângulo de contato dos filmes de CB, obtidos por BHANTHUMNAVIN et al.¹⁵, demonstram que após o tratamento a plasma de O_2 , realizado durante 3 minutos, variando-se a pressão em 0,1, 0,5 e 1,0 Torr, foi reduzido de 35° (antes do tratamento) para 29° , 28° e 26° (após o tratamento). Em sua outra condição de tratamento, a amostra submetida a exposição de 1 minuto, com pressão de 1,0 Torr, apresentou ângulo de contato correspondente 30° . Demonstrando que, aparentemente os filmes de CB apresentam uma tendência a se tornarem mais hidrofílicos com o aumento do tempo de exposição ao plasma de O_2 . De acordo com JANINE et al. (2017), o ângulo de contato de suas amostras de celulose vegetal, submetidas ao tratamento a plasma de O_2 durante 5, e 60 minutos, a uma pressão fixa de 0,1 Torr, foi considerado 0° , pois os líquidos (água e diiodometano) se espalharam rapidamente ao entrarem em contato com a superfície da CB, impossibilitando sua medição.

No estudo realizado por BENEVUTO et al.²⁹, com aumento do tempo de exposição das amostras de CB, durante 2,5 e 5 minutos, ao plasma de oxigênio, o ângulo de contato aumentou, esse comportamento foi atribuído às mudanças significativas no micro e nanorugosidade observada pelas análises de AFM, que contribuíram para uma adesão mais forte entre a superfície do material e a água.

5.6) Ensaio Antimicrobiano

O início dos testes microbiológicos foi realizado a partir da análise do halo de inibição gerado nas culturas dos diferentes microrganismos testados



com os filmes compósitos de CB/Ag₃PO₄ (FIGURA 5.25).

FIGURA 5.26 - Resultados do ensaio antimicrobiano de difusão em ágar da celulose bacteriana e dos compósitos de CB/Ag₃PO₄, sem o tratamento a plasma, contra as bactérias gram-positiva e gram-negativa, e o fungo patogênico.

De acordo com os resultados obtidos, todos os compósitos de CB/Ag₃PO₄ apresentaram um determinado grau de atividade inibitória, com

maior atividade para o fungo *C. albicans*. O compósito 0,0001_CB/Ag₃PO₄, sintetizado com a menor concentração dos reagentes precursores de Ag₃PO₄, não apresentou atividade inibitória contra nenhuma bactéria testada. O halo de inibição e seus respectivos diâmetros estão dispostos na TABELA 5.7.

TABELA 5.7 Medidas do halo de inibição (em mm), correspondentes a CB pura e dos compósitos de CB/Ag₃PO₄.

Microorganismos testados	Grupos					
	Controle (-) *	Controle (+) **	CB pura	0,0001 – CB/Ag ₃ PO ₄	0,0005 – CB/Ag ₃ PO ₄	0,001 – CB/Ag ₃ PO ₄
<i>S.aureus</i>	0 cm	1,2 cm	0 cm	0,1 cm	0,1 cm	0 cm
<i>E.coli</i>	0 cm	1,2 cm	0 cm	0 cm	0,1 cm	0 cm
<i>C. albicans</i>	0 cm	1,4 cm	0 cm	0,2 cm	0,4 cm	0,3 cm

*Controle (-): disco de papel filtro embebido em água destilada.

**Controle (+): disco de papel filtro embebido em solução de digluconato de clorexidina 0,12%.

A atividade biológica dos filmes de CB/Ag₃PO₄ está associada a incorporação das partículas de Ag₃PO₄. Estudos comprovam que baixas concentrações ($\approx 0,0003 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) de micropartículas de Ag₃PO₄ apresentam eficácia contra a bactéria *S. aureus* ^(56,58).

Um dos mecanismos biocidas consistem na presença das espécies reativas de oxigênio (EROS) na superfície das partículas de Ag₃PO₄ ¹⁸. De acordo com RIBEIRO et al. ¹⁸, a atividade biocida do Ag₃PO₄ está associada não só a capacidade de oxidação e redução das EROS, mas também sobre a variedade das reações de formação de radicais em cadeia, oriundas da oxidação da água (H₂O), que geram espécies: $\cdot\text{OH}$, H₂O₂, $\cdot\text{O}_2^-$ e da redução do oxigênio (O₂), que geram espécies: $^1\text{O}_2$, H₂O₂ e $\cdot\text{OH}$, responsáveis pela oxidação e pelo rompimento das membranas e de outros componentes

celulares dos microrganismos. Outro mecanismo de inibição microbiana, consiste na difusão e/ou migração moderada dos cátions Ag^+ , pelas células antimicrobianas, essa interação com a membrana celular, pode ocasionar a instabilidade do mecanismo celular e posterior morte das bactérias. No estudo realizado por SINGH et al. (2022), foi demonstrada a viabilidade do emprego de partículas de Ag_3PO_4 (APNs), com tamanho dentre 675 a 800 nm, para efeito biocida. Neste estudo, as APNs sintetizadas na morfologia cúbica, apresentaram maior atividade antimicrobiana, testadas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, que as partículas de morfologia rômbrica dodecaédrica e tetraédrica, sugerindo que a atividade antibacteriana desses compostos está associada a superfície da partícula.

Não foram observadas diferenças significativas no halo de inibição dos compósitos sem e com tratamento a plasma de O_2 (FIGURA 5.26). Com base nos resultados obtidos, podemos notar que os filmes de celulose bacteriana pura antes e após a exposição ao plasma de oxigênio (CB Pura, CBP – 2, 5 minutos e CBP – 5 minutos) não apresentaram zonas de inibição, como já era esperado.

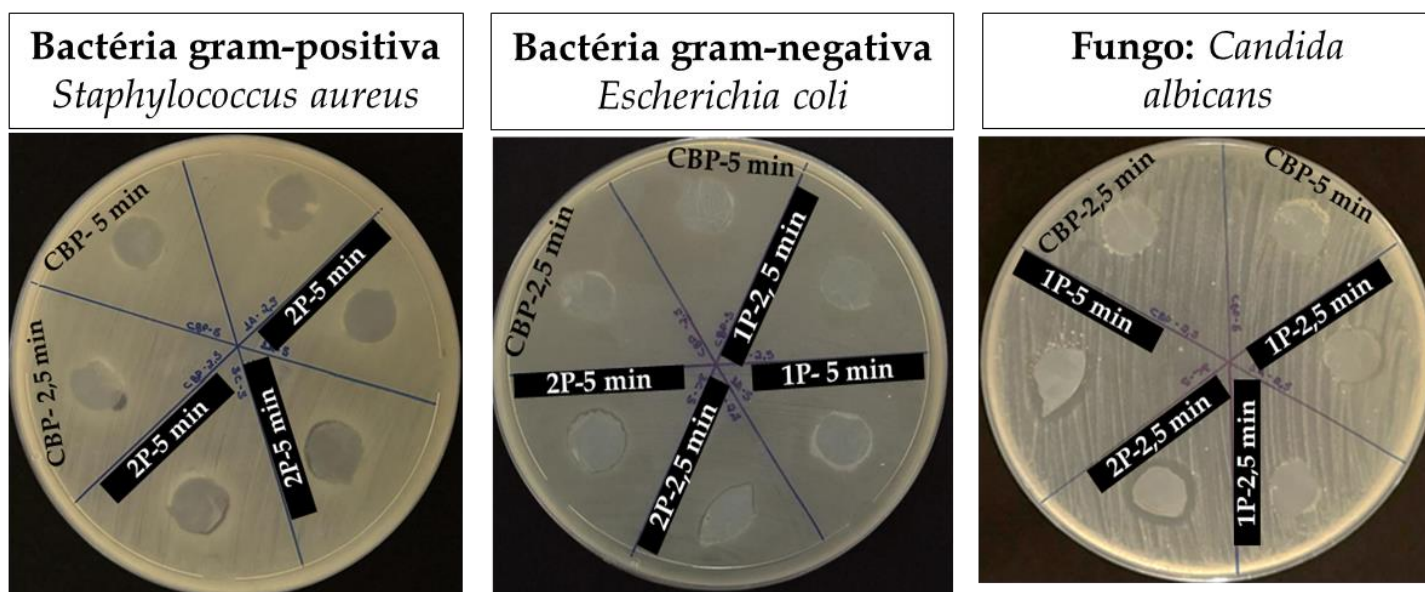


FIGURA 5.27 - Resultados do ensaio antimicrobiano de difusão em ágar da celulose bacteriana e dos compósitos de CB/Ag₃PO₄, após o tratamento a plasma, contra as bactérias gram-positiva e gram-negativa, e o fungo patogênico.

Após o tratamento a plasma de O₂, o compósito 0,0001_CB/Ag₃PO₄ não apresentou inibição contra nenhuma das espécies dos microrganismos testados. Sendo assim, pode-se inferir que, nesta amostra, o tratamento a plasma de O₂ realizado durante 2,5 e 5 minutos não foi suficiente para expor as partículas de Ag₃PO₄, incorporadas a celulose bacteriana. O compósito 0,001_CB/Ag₃PO₄, após o tratamento a plasma, apresentou halo de inibição contra todos os microrganismos testados, como é possível observar nas amostras 2P – 2, 5 minutos e 2P – 5 minutos (TABELA 5.8), inclusive contra a bactéria gram-negativa *E.coli*, que não apresentava halo de inibição antes da modificação. Sugerindo que nesta amostra, as partículas de Ag₃PO₄ tornaram-se mais expostas na região superficial do compósito, como foi observado na micrografia de AFM (5.19 e 5.20 - d), favorecendo o contato entre o microrganismo patogênico e o agente antimicrobiano ²⁵.

TABELA 5.8 - Medidas do halo de inibição (em mm), correspondentes a CB pura e aos compósitos de CB/Ag₃PO₄ após o tratamento a plasma

Microrganismos testados	Grupos							
	Controle (-) *	Controle (+) **	CBP – 2,5 minutos	CBP – 5 minutos	1P – 2,5 minutos	1P – 5 minutos	2P – 2,5 minutos	2P – 5 minutos
<i>S.aureus</i>	0 cm	1,2 cm	0 cm	0 cm	0 cm	0 cm	0,1 cm	0,1 cm
<i>E.coli</i>	0 cm	1,2 cm	0 cm	0 cm	0 cm	0 cm	0,1 cm	0,1 cm
<i>C. albicans</i>	0 cm	1,4 cm	0 cm	0 cm	0 cm	0 cm	0,4 cm	0,3 cm

*Controle (-): disco de papel filtro embebido em água destilada.

**Controle (+): disco de papel filtro embebido em solução de digluconato de clorexidina 0,12%.

Conforme os resultados obtidos por meio do ensaio antimicrobiano de difusão em ágar, os compósitos apresentaram um pequeno halo de inibição, em relação ao material controle, o antisséptico clorexidina. Entretanto, esse resultado não pode ser atribuído apenas a uma baixa capacidade do compósito de inibir o crescimento microbiano, pois a técnica de difusão em ágar consiste em uma análise qualitativa e possui limitações. Esse método é baseado na difusão, por meio do ágar, de um agente antimicrobiano impregnado a um disco de papel filtro ⁹³. Portanto, se as partículas de Ag_3PO_4 , responsáveis pela atividade antimicrobiana do compósito, não apresentam uma elevada capacidade de se difundir em meio de ágar, esse teste demonstra-se insatisfatório para avaliar a capacidade do compósito em inibir o crescimento microbiano. Sendo necessário efetuar novos testes para determinar a atividade antimicrobiana do material.

6. Considerações Finais

A metodologia empregada para desenvolver filmes compósitos constituídos por celulose bacteriana e fosfato de prata foi eficiente. A incorporação “*in situ*” das partículas de Ag_3PO_4 nos filmes de CB foram comprovadas por meio das análises de FTIR-ATR, DRX e MEV-EDS. Os espectros de FTIR, demonstraram a presença dos grupos funcionais contidos no Ag_3PO_4 , evidenciado pelo deslocamento do espectro na amostra 0,001_CB/ Ag_3PO_4 . As análises de MEV demonstraram que foram sintetizadas micropartículas distribuídas e aglomeradas, com tamanhos entre 500 e 200 nm. Os índices de cristalinidade, obtidos por meio das análises de

DRX para os filmes compósitos foi maior que o da celulose bacteriana pura, passando de 78,31 % para 92,07%.

Analisando as curvas de TG, foi possível constatar que houve um aumento na temperatura inicial de perda de massa (T_i), indicando que nas condições analisadas a presença das partículas de Ag_3PO_4 retardam o início dos processos de degradação do biopolímero. Conforme os valores obtidos de ΔT , notou-se que a presença das partículas de Ag_3PO_4 inseridas no material, aceleram o processo de perda de massa.

O tempo de exposição ao plasma, aos quais as amostras são submetidas, podem ocasionar um aumento na nanorugosidade do material, ainda mais evidenciado nos materiais compósitos devido a presença das micropartículas de Ag_3PO_4 , como podemos observar nas imagens geradas por AFM. Esses resultados corroboram com os resultados de ângulo de contato obtidos, que demonstraram um aumento da hidroflicidade do material com o aumento do tempo de exposição do compósito ao plasma de oxigênio. Além disso, o tratamento a plasma pode promover a exposição das micropartículas na superfície do compósito, promovendo o contato mais eficaz entre o microrganismo patógeno e a substância antimicrobiana, potencializando o efeito antisséptico do material.

Foi possível obter filmes compósitos com potencial atividade antimicrobiana utilizando-se baixas concentrações de Ag_3PO_4 . A amostra 0,0005_CB/ Ag_3PO_4 apresentou um halo de inibição mais expressivo contra todos os microrganismos testados, em relação aos outros compósitos. Nessa amostra foi observada a presença de micropartículas de Ag_3PO_4 dispersas e aglomeradas, com tamanhos de aproximadamente 0,236 μm . E, de acordo com as análises de TGA, essa amostra apresenta o menor percentual residual correspondente a 1,12 %. Enquanto as outras amostras: 0,0001_CB/ Ag_3PO_4 e 0,001_CB/ Ag_3PO_4 , apresentaram respectivamente um resíduo de 5,41 e

5,63 %. Na amostra 0,001_CB/Ag₃PO₄, que apresentou maior atividade inibitória para o fungo *C. albicans* antes do tratamento a plasma de oxigênio, foi evidenciada a presença de micropartículas aglomeradas com tamanho semelhante a amostra 0,0005_CB/Ag₃PO₄ correspondentes a 0,228 μm, indicando que os diferentes tamanhos das partículas e a disposição delas nos compósitos influenciam nas atividades inibitórias da substância.

Como foi demonstrado por meio do teste de citotoxicidade celular, esse material apresenta uma viabilidade celular acima de 70%, atestando a segurança do material para aplicações em materiais e dispositivos médicos.

A CB é um biopolímero bastante empregado na área biomédica, sua elevada biocompatibilidade e área superficial, possibilitam sua utilização como uma plataforma para regeneração tecidual que pode ser associada a entrega de fármacos, ampliando a sua aplicação. A incorporação de um agente antimicrobiano permite o desenvolvimento de um material híbrido, com potencial biocida, prevenindo contaminações por microrganismos patógenos. As alterações topográficas e mudanças no caráter hidrofílico/hidrofóbico, resultantes da modificação superficial dos materiais compósitos de CB/Ag₃PO₄ por plasma permitem a investigação de suas propriedades físico-químicas de superfície, visto que essas modificações podem influenciar na biocompatibilidade, no potencial antimicrobiano e nas propriedades de adesão do polímero, promovendo o desenvolvimento de um material híbrido mais completo com potencial para diversas aplicações.

7. Referências Bibliográficas

1. JAWAD, A. J. “Antiviral Polymer Nano Composites (PNC) for Healthcare Applications: A Coronavirus Short Review,” 5,6,7, 2020.
2. LANA, R. M., COELHO, F. C., GOMES, M. F. D. C., CRUZ, O. G., BASTOS, L. S., VILLELA, D. A. M., & CODEÇO, C. T. “Emergência do novo coronavírus (SARS-CoV-2) e o papel de uma vigilância nacional em saúde oportuna e efetiva”. *Cadernos de Saúde Pública*, 36, e00019620, 2020.
3. ROCHA, L. “Entenda por que a OMS alerta para a emergência de uma nova doença”. <https://www.cnnbrasil.com.br/saude/entenda-por-que-a-oms-alerta-para-a-emergencia-de-uma-nova-doenca/>. Acesso em: 24 de janeiro de 2024.
4. JOSÉ, N. M.; PRADO, L. “Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações”. *Química Nova*, v. 28, p. 281-288, 2005.
5. NEVES, N. M., REIS, R. L. “Biomaterials from nature for advanced devices and therapies”. John Wiley & Sons, 2016.
6. BROWN, A. J. “On an acetic ferment which forms cellulose”. *Journal of the Chemical Society. Transactions*, v. 49, p. 432, 1886.
7. LIMA, L. R., SANTOS, D. B., SANTOS, M. V. et al. NANOCRISTAIS DE CELULOSE A PARTIR DE CELULOSE BACTERIANA. *Química Nova* [online]. 2015, v. 38, n. 9 [Acessado 26 Janeiro 2024], pp. st4042.20150131>. ISSN 1678-7064.

8. VIEIRA, D. C. M. Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por *Gluconacetobacter xylinus* em meio de resíduos de frutas e folhas de chá verde. Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo, 2013.
9. AZEREDO, H. M. C.; BARUD, H., FARINAS, C. S. et al. "Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*", v.3, p.7, 2019.
10. HUANG, Y., ZHU, C., YANG, J. et al. "Recent advances in bacterial cellulose". *Cellulose* 21, p. 1–30, 2014.
11. ESA, F., TASIRIN, S. M., RAHMAN, N. A. "Overview of Bacterial Cellulose Production and Application, Agriculture and Agricultural Science. *Procedia*, Volume 2, 113-119, ISSN 2210 7843, 2014.
12. POGORELOVA, N., ROGACHEV, E., DIGEL, I. et al. "Bacterial Cellulose Nanocomposites: Morphology and Mechanical Properties. *Materials*", 13(12), 2849, 2020.
13. DENG, C. B. L., C., WANG, Z., HAN, M., JIN, Z., ZHOU, S., CHEN, S., GU. "A biological antimicrobial agent functionalized bacterial cellulose-based wound dressing". *Cellulose*, 1-13, 2024.
14. KURNIAWAN, HENGKY, JINN-TSYI LAI, AND MENG-JIY WANG. "Biofunctionalized bacterial cellulose membranes by cold plasmas." *Cellulose* 19 (2012): 1975-1988.
15. BHANTHUMNAVIN, W., WANICHAPICHART, P., TAWEEPREEDA, W., SIRIJARUKULA, S., & PAOSAWATYANYONG, B. Surface modification of bacterial cellulose membrane by oxygen plasma treatment. *Surface and Coatings Technology*, 306, 272-278, 2016.
16. VIANA, A. V., VIANA, D. D. S. F., DE FIGUEIRÊDO, G. S., DE BRITO, J. E. et al. "Potencial antimicrobiano das nanopartículas de prata

- estabilizadas em curcumina e extrato de folhas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.)”. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 9, p. e47610918364-e47610918364, 2021.
17. BAYÓN, B., CACICEDO, M. L., ÁLVAREZ, V. A. et al. “Self-Assembly Stereo-Specific Synthesis of Silver Phosphate Microparticles on Bacterial Cellulose Membrane Surface For Antimicrobial Applications”. *Colloid and Interface Science Communications*, 26, 7–13, 2018.
18. RIBEIRO, L. K., ASSIS, M., LIMA, L. R. et al. “Bioactive Ag₃PO₄/Polypropylene Composites for Inactivation of SARS-CoV-2 and Other Important Public Health Pathogens”. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 125, n. 38, p. 10866-10875, 2021.
19. WU, A., TIAN, C., CHANG, W. et al. “Morphology-controlled synthesis of Ag₃PO₄ nano/microcrystals and their antibacterial properties”. *Materials Research Bulletin*, 48(9), 3043–3048, 2013.
20. REN, J., CHAI, Y., LIU, Q., ZHANG, L. et al. “Intercorrelated Ag₃PO₄ nanoparticles decorated with graphitic carbon nitride: Enhanced stability and photocatalytic activities for water treatment”. *Applied Surface Science*, v. 403, p. 177–186, 2017.
21. TRENCH, A. B., MACHADO, T. R., GOUVEIA, A. F., ASSIS, M., DA TRINDADE, L. G., SANTOS, C., LONGO, E. “Connecting structural, optical, and electronic properties and photocatalytic activity of Ag₃PO₄:Mo complemented by DFT calculations. *Applied Catalysis*” B: *Environmental*, 238, 198–211, 2018.
22. HUANG, G. F. et al. “Ag₃PO₄ semiconductor photocatalyst: possibilities and challenges”. *Journal of Nanomaterials*, v. 2013, p. 1-1, 2013.

23. TRENCH, ALINE B. et al. "Rational design of W-doped Ag₃PO₄ as an efficient antibacterial agent and photocatalyst for organic pollutant degradation". *ACS omega*, v. 5, n. 37, p. 23808-23821, 2020.
24. WANG, Q., CAI, J., ZHANG, L. In situ synthesis of Ag₃PO₄/cellulose nanocomposites with photocatalytic activities under sunlight. *Cellulose*, v. 21, p. 3371-3382, 2014.
25. ESPAÑA-SÁNCHEZ, B. Liliana et al. "Nanocompuestos de polipropileno con nanopartículas de cobre: preparación, activación superficial por plasma y actividad antibacteriana". *Acta Universitaria*, v. 24, n. 3, p. 13-24, 2014.
26. FRIDMAN, A. *Plasma chemistry*. Cambridge university press, 2008.
27. PULIYALIL, H.; CVELBAR, U. "Selective plasma etching of polymeric substrates for advanced applications". *Nanomaterials*, v. 6, n. 6, p. 108, 2016.
28. SINGH, K., GUJJU, R., BANDARU, S., MISRA, S., BABU, K. S., PUVVADA, N. "Facet-Dependent Bactericidal Activity of Ag₃PO₄ Nanostructures against Gram-Positive/Negative Bacteria". *ACS omega*, 7(19), 16616-16628, 2022.
29. BENEVENUTO, L. G. D., DA SILVA BARUD, H., CRUZ, S. A., CAILLIER, B., DA SILVA PAIVA, R., ACHCAR, J. A., ONTREZOR, L. H. (2023). "Bacterial cellulose-based cell culture platform modified by oxygen plasma for tissue engineering applications". *Cellulose*, 30(15), 9625-9634.
30. HEINZE, THOMAS; EL SEOUD, OMAR A.; KOSCHELLA, ANDREAS. "Cellulose derivatives: synthesis, structure, and properties". Springer, 2018.

31. SIMAN FILHO, A. J., SANFELICE, R. C. “Estudo bibliográfico sobre polímeros ambientalmente sustentáveis”. *Revista brasileira de ciência, tecnologia e inovação*, 3(2), p. 131-148, 2018.
32. BRITO, G. F., AGRAWAL, P., ARAÚJO, E. M., MÉLO, T. J. A. “Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes”. *Revista eletrônica de materiais e Processos*, 6(2), p. 127-139, 2011.
33. MUTHU, SENTHILKANNAN, S., RATHINAMOORTHY, R. *Bacterial Cellulose: Sustainable Material for Textiles*. Springer Nature, 2021.
34. DONINI, Í. A., DE SALVI, D. T., FUKUMOTO, F. K., LUSTRI, W. R., BARUD, H. S., MARCHETTO, R., RIBEIRO, S. J. “Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana”. *Eclética Química*, 35, p. 165-178, 2010.
35. LEE K.Y., BULDUM, G., MANTALARIS, A., BISMARCK, A. “More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites.” *Macromol Biosci*. Jan.14(1), p.10-32, 2014.
36. ANDRADE, F. K., PERTILE, R., DOURADO, F., GAMA, F. M. “Bacterial Cellulose: Properties , Production and Applications”. In: LEJEUNE, A. T. D. (Ed.). *Cellulose: Structure and Properties*. [s.l: s.n.]. p. 427–458, 2010.
37. JENKHONGKARN, R.;PHISALAPHONG, M. “Effect of reduction methods on the properties of composite films of bacterial cellulose-silver nanoparticles”. *Polymers*, v. 15, n. 14, p. 2996, 2023.
38. CACICEDO, M. L., CASTRO, M. C., SERVETAS, I., BOSNEA, L., BOURA, K., TSAFRAKIDOU, P., CASTRO, G. R. “Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications”. *Bioresource technology*, 213, 172-180, 2016.

39. CREDOU, J., BERTHELOT, T. “Cellulose: from biocompatible to bioactive material”. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(30), 4767-4788, 2014.
40. BARUD, H. da S. Preparo e caracterização de novos compósitos de celulose bacteriana. 2006.
41. SILVA, M. T. da. Produção de eletrodo compósito a base de celulose bacteriana modificada com folhas de grafite. 2020.
42. NASCIMENTO, E. dos S. Filmes nanocompósitos à base de celulose bacteriana e nanocristais de celulose. 2018.
43. SUWANPOSRI, A., YUKPHAN, P., YAMADA, Y., OCHAIKUL, D. “Statistical optimisation of culture conditions for biocellulose production by *Komagataeibacter*” sp. PAP1 using soya bean whey. *Maejo International Journal of Science and Technology*, v. 8, n. 1, p. 1, 2014.
44. REVIN, V., LIYASKINA, E., NAZARKINA, M., BOGATYREVA, A., SHCHANKIN, M. “Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products”. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 151-159, 2018.
45. SOUZA, E. F., FURTADO, M. R., CARVALHO, C., FREITAS-SILVA, O., GOTTSCHALK, L. “Production and characterization of *Gluconacetobacter xylinus* bacterial cellulose using cashew apple juice and soybean molasses”. *International journal of biological macromolecules*, 146, p. 285–289, 2020.
46. AMORNPITOKSUK, P., INTARASUWAN, K., SUWANBOON, S., BALTRUSAITIS, J. Effect of phosphate salts (Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , and NaH_2PO_4) on Ag_3PO_4 morphology for photocatalytic dye degradation under visible light and toxicity of the degraded dye products. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(49), 17369-17375, 2013.

47. LIN, W. C., LIEN, C. C., YEH, H. J., YU, C. M., HSU, S. H. (2013).” Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications”. *Carbohydrate polymers*, 94(1), 603-611.
48. ATTA, O. M., MANAN, S., UL-ISLAM, M., AHMED, A. A. Q., ULLAH, M. W., YANG, G. “Silver decorated bacterial cellulose nanocomposites as antimicrobial food packaging materials”. *ES Food & Agroforestry*, 6, 12-26, 2021.
49. BRUNA, T., MALDONADO-BRAVO, F., JARA, P., CARO, N. Silver nanoparticles and their antibacterial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7202, 2021.
50. GLIGA, A.R., S. SKOGLUND, I.O. WALLINDER, B. FADEEL, H.L. KARLSSON, “Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release”, Part. Fibre Toxicol. 11 (1) (2014).
51. M.V.D.Z. PARK, A.M. NEIGH, J.P. VERMEULEN, L.J.J. DE, H.W. VERHAREN, J.J. BRIEDÉ, et al., “The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles”, *Biomaterials* 32, 9810–9817, 2011.
- 52.A. IVASK, I. KURVET, K. KASEMETS, I. BLINOVA, V. ARUOJA, S. SUPPI, et. al. “Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro”, *PLoS One* 9,102–108, 2014.
- 53.LI, X., XU, P., CHEN, M., ZENG, G., WANG, D., CHEN, F., TANG, W., CHEN, C., ZHANG, C., TAN, X. “Application of Silver PhosphateBased Photocatalysts: Barriers and Solutions”. *Chem. Eng. J.*, 366, 339–357,2019

54. ZWARA, J., GRABOWSKA, E., KLIMCZUK, T., LISOWSKI, W., ZALESKA-MEDYNSKA, A. “ Shape-dependent enhanced photocatalytic effect under visible light of Ag₃PO₄ particles”. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 367, 240-252, 2018.
55. STECKIEWICZ, K. P., ZWARA, J., JASKIEWICZ, M., KOWALSKI, S., KAMYSZ, W., ZALESKA-MEDYNSKA, A., & INKIELEWICZ-STEPNIAK, I. “Shape-dependent biological properties of Ag₃PO₄ microparticles: evaluation of antimicrobial properties and cytotoxicity in in vitro model”—safety assessment of potential clinical usage. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
56. YEO, B. E. SEO, Y. PARK, H. & HUH, Y. D. “Facet Effect of Ag₃PO₄ Crystals on Antibacterial Activities,” *Bulletin of the Korean Chemical Society*, vol. 36, no. 7, pp. 1904–1907, 2015.
57. PANTHI, G. RANJIT R., KIM, H. Y., & D. DAS MULMI, “Size dependent optical and antibacterial properties of Ag₃PO₄ synthesized by facile precipitation and colloidal approach in aqueous solution,” *Optik*, vol. 156, pp. 60–68, 2018.
58. CHUDOBOVA, D. CIHALOVA, DOSTALOVA, K. S. et al., “Comparison of the effects of silver phosphate and selenium nanoparticles on *Staphylococcus aureus* growth reveals potential for selenium particles to prevent infection,” *FEMS Microbiology Letters*, vol. 351, no. 2, pp. 195–201, 2014.
59. SOUZA, E. E. B. de. "Caracterização de sucata recuperada a partir de escórias siderúrgicas e sua utilização em um forno elétrico a arco" 2016.
60. GOMES, M. P. *Microplasmas em equilíbrio de Excitação*. Tese (Doutorado em Física Atômica e Molecular) – Instituto Tecnológico de Aeronáutica, São José dos Campos. 2011.

61. RIDENTI, M. A. Diagnóstico e modelagem de plasmas gerados por micro-ondas e aplicações. Universidade Estadual de Campinas, 2014.
62. PINHEIRO, C. J. G., et al. "Caracterização de plasmas frios por espectroscopia óptica de emissão." (2019).
63. FEITOR, M. C., COSTA, T. H. C., BARBOSA, J. C. P., MEDEIROS, E. S., ALVES Jr, C. "Diagnóstico do plasma de oxigênio por espectroscopia de emissão óptica durante o tratamento de tecidos 100% poliéster" , 2008.
64. JESUS, L. A. O. de. Desenvolvimento e modificação a plasma de materiais a base de poli (ácido láctico)/ α -Ag₂WO₄ com potencial ação antimicrobiana, 2022. BLANCHETTE, V. et al. "New antibacterial paper made of silver phosphate cellulose fibers: a preliminary study on the elimination of *Staphylococcus aureus* involved in diabetic foot ulceration". *BioMed Research International*, v. 2020, 2020.
65. WANG, Q.; CAI, J.; ZHANG, L. In situ synthesis of Ag₃PO₄/cellulose nanocomposites with photocatalytic activities under sunlight". *Cellulose*, v. 21, p. 3371-3382, 2014.
66. YAN, T.G et al. "Improving the photocatalytic performance of silver phosphate by thermal annealing: Influence of acetate species". *Journal of Alloys and Compounds*, v. 680, p. 436-445, 2016.
67. KAITHERI, A., PADMANABHAN, S. K., PAL, S., STOPPA, M., & LICCIULLI, A. "Silver phosphate–bacterial cellulose nanocomposites as visible light photocatalyst for wastewater purification. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*", p. 100365, 2023.
68. OLIVEIRA, L. P. Síntese, caracterização de fosfato de prata (Ag₃PO₄) e sua ação contra *Candida albicans* associado com luz LED. 2018.

69. PAL, S. et al. “Silver-functionalized bacterial cellulose as antibacterial membrane for wound-healing applications”. *ACS omega*, v. 2, n. 7, p. 3632-3639, 2017.
70. PEROTTI, G. F. et al. “Bacterial cellulose–laponite clay nanocomposites”. *Polymer*, v. 52, n. 1, p. 157-163, 2011.
71. BARUD, H. da S. et al. “Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes”. *Materials Science and Engineering: C*, v. 28, n. 4, p. 515-518, 2008.
72. BARUD, H. et al. “Thermal characterization of bacterial cellulose–phosphate composite membranes”. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 87, n. 3, p. 815-818, 2007.
73. BARUD, H. S. *Preparo e caracterização de novos compósitos de celulose bacteriana*. 2006.
74. OLIVEIRA, R. L. de. *Preparação e caracterização de derivados celulósicos obtidos a partir da celulose bacteriana e obtenção de filmes para aplicações óticas*. 2013.
75. ADEPU, S.; KHANDELWAL, M. “Broad-spectrum antimicrobial activity of bacterial cellulose silver nanocomposites with sustained release”. *Journal of Materials Science*, v. 53, n. 3, p. 1596-1609, 2018.
76. SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN, A. E.; CONRAD, C. M. “An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer”. *Textile research journal*, v. 29, n. 10, p. 786-794, 1959.
77. WU, J., ZHENG, Y., SONG, W., LUAN, J., WEN, X., WU, Z., GUO, S. “In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites

- for slow-released antimicrobial wound dressing.” *Carbohydrate polymers*, 102, 762-771, 2014.
78. TORGBO, Selorm; SUKYAI, Prakt. “Biodegradation and thermal stability of bacterial cellulose as biomaterial: The relevance in biomedical applications”. *Polymer Degradation and Stability*, v. 179, p. 109232, 2020.
79. LIU, J.K., LUO, C.X., WANG, J.-D., YANG, X.-H., ZHONG, X.-H. “Controlled synthesis of silver phosphate crystals with high photocatalytic activity and bacteriostatic activity”. *CrystEngComm*, 14(24), 8714. doi:10.1039/c2ce25604e, 2012.
80. FITARONI, L. B., DE LIMA, J. A., CRUZ, S. A., WALDMAN, W. R. “Thermal stability of polypropylene–montmorillonite clay nanocomposites: Limitation of the thermogravimetric analysis”. *Polymer Degradation and Stability*, v. 111, p. 102-108, 2015.
81. DAS, M., ZANDRAA, O., MUDENUR, C., SAHA, N., SÁHA, P., MANDAL, B., KATIYAR, V. “Composite scaffolds based on bacterial cellulose for wound dressing application”. *ACS Applied Bio Materials*, 5(8), 3722-3733, 2022.
82. SILVA, C. M. D., BOTTENE, M. K., BARUD, H. G. D. O., BARUD, H. D. S., LIGABUE, R. A., JAHNO, V. D. “Wettability and morphological characterization of a polymeric bacterial cellulose/corn starch membrane”. *Materials Research*, 18, 109-113, 2015.
83. BETLEJ, I., SALERNO-KOCHAN, R., JANKOWSKA, A., KRAJEWSKI, K., WILKOWSKI, J., RYBAK, K., BORUSZEWSKI, P. “The Impact of the mechanical modification of bacterial cellulose films on selected quality parameters”. *Coatings*, 11(11), 1275, 2021.

84. CUNHA, A. G., GANDINI, A. "Turning polysaccharides into hydrophobic materials: a critical review. Part 1. Cellulose." *Cellulose*, v. 17, p. 875-889, 2010.
85. VOLOVA, T. G., SHUMILOVA, A. A., SHIDLOVSKIY, I. P., NIKOLAEVA, E. D., SUKOVATIY, A. G., VASILIEV, A. D., SHISHATSKAYA, E. I. "Antibacterial properties of films of cellulose composites with silver nanoparticles and antibiotics". *Polymer Testing*, 65, 54-68, 2018.
86. FOWKES, F. M. "Attractive forces at interfaces". *Industrial & Engineering Chemistry*, 56 (12): 40, 1964.
87. UMEZAWA, N., YE, J. "Theoretical study of high photocatalytic performance of Ag_3PO_4 ". *Phys. Rev. B*, v. 83, p. 035202, 2011.
88. CAMARGO, J. S. G. D., MENEZES, A. J. D., CRUZ, N. C. D., RANGEL, E. C., DELGADO-SILVA, A. D. O. "Morphological and chemical effects of plasma treatment with oxygen (O_2) and sulfur hexafluoride (SF_6) on cellulose surface". *Materials Research*, 20, 842-850, 2018.
89. LEAL, S., CRISTELO, C., SILVESTRE, S., FORTUNATO, E., SOUSA, A., ALVES, A., GAMA, M. "Hydrophobic modification of bacterial cellulose using oxygen plasma treatment and chemical vapor deposition". *Cellulose*, 27, 10733-10746, 2020.
90. DORAI, R. KUSHNER, M. J. "A model for plasma modification of polypropylene using atmospheric pressure discharges". *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36 (6): 666, 2003.

91. CALVIMONTES A, MAUERSBERGER P, NITSCHKE M, DUTSCHK V, SIMON F. "Effects of oxygen plasma on cellulose surface". *Cellulose* 18:803–809, 2011.
92. SEJAS, L. M., SILBERT, S., REIS, A. O., SADER, H. S. "Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil". *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 39, 27-35, 2003.
93. WU, S. "Calculation of interfacial tension in polymer systems". *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia*, 34 (1): 19, 1971.
94. WENS, D. K., WENDT, R. C. "Estimation of the surface free energy of polymers". *Journal of applied polymer science*, 13 (8): 1741, 1969.
95. PAIVA, R. da S. "Polipropileno reciclado para contato com alimento: etching e deposição de filmes de carbono amorfo hidrogenado por plasma", 2020.
96. SASKA, S., BARUD, H.S., GASPAR, A.M.M., MARCHETTO, R., RIBEIRO S.J.L., MESSADDEQ, Y. "Bacterial Cellulose-Hydroxyapatite", *International Journal of Biomaterials*, vol.2011, 2011.
97. TEIXEIRA, S. R. Z., REIS, E. M. D., APATI, G. P., MEIER, M. M., NOGUEIRA, A. L., GARCIA, M. C. F., PORTO, L. M. "Biosynthesis and functionalization of bacterial cellulose membranes with cerium nitrate and silver nanoparticles". *Materials Research*, 22, e20190054, 2019.
98. SAPIEHA, S.; WROBEL, A. M.; WERTHEIMER, M. R. Plasma-assisted etching of paper. *Plasma chemistry and plasma processing*, v. 8, p. 331-346, 1988.

99. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, “Biological evaluation of medical devices”. Part 12: *Sample preparation and reference materials*, 4 ed, ISO 10993-12, 2012.
100. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, “Biological evaluation of medical devices”. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods”, 3st ed, ISO 10993-5, 2009.
101. MOSMANN, T. “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays”. *J Immunol Methods*, v. 16, p. 55-63, 1983. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
102. R Core Team R. “A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing”, Vienna, Austria, 2019. <https://www.R-project.org/>.
103. CHOI, S. M., RAO, K. M., ZO, S. M., SHIN, E. J., HAN, S. S. “Bacterial cellulose and its applications”. *Polymers*, 14(6), 1080, 2022.
104. NCCLS. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. “Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. United States”, Pennsylvania, 2003.
105. VOLOVA, T. G., PRUDNIKOVA, S. V., KISELEV, E. G., NEMTSEV, I. V., VASILIEV, A. D., KUZMIN, A. P., & SHISHATSKAYA, E. I. “Bacterial cellulose (BC) and BC composites: Production and properties”. *Nanomaterials*, 12(2), 192, 2022.