

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MATERIAIS PARA ENGENHARIA

**Desenvolvimento de membranas antimicrobianas a partir  
da extração e purificação da celulose da casca da batata**

DEBORA FERREIRA LAURITO FRIEND

Itajubá/MG  
Julho, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MATERIAIS PARA ENGENHARIA

DEBORA FERREIRA LAURITO FRIEND

**Desenvolvimento de membranas antimicrobianas a partir  
da extração e purificação da celulose da casca da batata**

Tese apresentada à Universidade Federal de Itajubá  
como parte dos requisitos para a obtenção do título  
de Doutor em Ciências dos Materiais no Programa  
de Pós-graduação em Materiais para Engenharia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Elena Leyva González  
Coorientador: Prof. Dr. Álvaro A. A. de Queiroz

Itajubá/MG  
Julho, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MATERIAIS PARA ENGENHARIA

DEBORA FERREIRA LAURITO FRIEND

**Desenvolvimento de membranas antimicrobianas a partir  
da extração e purificação da celulose da casca da batata**

Tese aprovada por banca examinadora em 4 de julho de 2019, conferindo à autora o título de Doutora em Ciências dos Materiais no Programa de Pós-graduação em Materiais para Engenharia.

Banca examinadora  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Charlene Aparecida Ribeiro  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Maria Fernanda Xavier P. Medeiros  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Daniela Sachs  
Prof. Dr. Antonio José Faria Bombard  
Prof. Dr. Álvaro A. A. de Queiroz (coorientador)  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Elena Leyva González (orientadora)

Itajubá/MG  
Julho, 2019

À Tia Lourdes, pelo  
tempo, pela presença,  
pelo amor, por tudo.

## AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus, Mãe Maria, meus Guias e Mentores pela conclusão de mais uma importante etapa no meu caminho.

Sou grata à toda a minha família – irmã, marido, cunhados, sogros, tias, primas e primos, e em especial aos meus pais, Arnaldo e Beth, por tanto amor e incentivos. Agradeço a Tia Lourdes e dedico esta Tese a ela, que sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida. Embora hoje sua presença não seja física, os laços que nos unem superam todos os limites.

Sou grata aos meus queridos companheiros pets – Fred (*In memoriam*), Jazz e Merlin. Criaturas que (aparentemente) pouco entendem sobre a lógica humana, mas diariamente nos mostram profundo conhecimento sobre a natureza divina.

Sou grata a todos os meus amigos de Pós, em especial à minha amiga Sara, por estar sempre disponível, tanto nos bons momentos, quanto naqueles não tão bons assim.

Agradeço à minha querida orientadora e educadora Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Elena Leyva González por todos os ensinamentos acadêmicos e de vida. Agradeço ao meu coorientador Prof. Dr. Álvaro A. A. de Queiroz por ser o idealizador deste projeto e por suas contribuições valiosas durante todo o percurso do trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Alta Tensão (LAT) pelo ótimo espaço e estrutura laboratorial concedida ao longo destes quatro anos.

Agradeço à Tereza Seither, proprietária do Restaurante Churras Vadinho (Itajubá/MG), pela doação das amostras de casca de batata utilizadas neste estudo.

Agradeço a todos os professores e técnicos da Universidade Federal de Itajubá. Principalmente aqueles do Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia e do Instituto de Físico-Química pela dedicação e profissionalismo.

A todos que contribuíram para a realização desta Tese, direta ou indiretamente, minha mais profunda gratidão.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

*Marie Curie*

“É necessário se espantar, se indignar e se contagiar. Só assim é possível mudar a realidade.”

*Nise da Silveira*

## RESUMO

LAURITO-FRIEND, D. F. **Desenvolvimento de membranas antimicrobianas a partir da extração e purificação da celulose da casca da batata**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), Itajubá/MG, 2019.

Os resíduos gerados pela agroindústria representam materiais abundantes e de baixo custo que podem ser transformados em produtos de valor agregado, com aplicação na área médica. Sendo o tratamento de feridas um problema de saúde pública, é importante buscar materiais cada vez mais baratos e sustentáveis para esta finalidade. Nesse sentido, a presente Tese buscou desenvolver um projeto inovador dentro das tecnologias “verdes”, isolando a celulose da casca da batata para a preparação de membranas antimicrobianas, por meio da biossíntese das nanopartículas de prata (Np-Ag), utilizando extrato de folhas de gerânio (*Pelargonium zonale*). O processo para extração e purificação da celulose da casca da batata, com conseqüente formação de filmes, foi feito utilizando hidróxido de sódio (NaOH) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a partir do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> na etapa de polpação alcalina. Os resultados mostraram que tanto a concentração quanto a temperatura influenciaram no rendimento, porém na formação de filmes (membrana), apenas o efeito da temperatura foi significativo. Dentre os ensaios em que houve obtenção de filme, o maior rendimento ocorreu nas condições de 0,5 mol/L de NaOH, a 80°C por 2,5h seguido do branqueamento com 15% m/m de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Análises FTIR deste material mostraram bandas características da celulose e ausência de bandas referentes à hemicelulose e lignina. Os espectros de DRX confirmaram que a celulose extraída apresentou padrão cristalino semelhante à celulose do tipo I e II e o índice de cristalinidade foi de 73,42%. O comportamento térmico da membrana, mostrou que cerca de 80% da cadeia de celulose foi degradada nas temperaturas de 340 e 442°C, com energia de ativação de 163,82 kJ/mol. O estudo do intumescimento mostrou que a membrana possui alto teor de inchaço (entre 200 e 300%) nas temperaturas de 10, 25 e 40°C e que a difusão não seguiu o modelo de Fick. Além disso, foi encontrada uma temperatura de transição de fase em torno de 40°C. Pelas análises de caracterização do extrato de gerânio através dos espectros de UV-visível e FTIR, verificou-se a presença de grupos químicos funcionais capazes de reduzir e estabilizarem os íons prata (Ag<sup>+</sup>) a Np-Ag. Esta redução em meio aquoso contendo extrato de gerânio foi confirmada através do aparecimento das bandas de absorção típicas da região de ressonância de plasmon de superfície (RPS) para as Np-Ag, em 370 e 470 nm. Análises DRX dos biocompósitos de fibra celulósica/nanopartícula de prata (FC/Np-Ag) mostraram que o perfil cristalino da matriz de celulose não foi modificado, embora observou-se uma diminuição da cristalinidade nas amostras que foram intumescidas em solução de Ag<sup>+</sup>. O tamanho médio das Np-Ag variou entre 20-12 nm. Ensaio microbiológicos revelaram que a atividade antimicrobiana das Np-Ag foi eficaz tanto para a bactéria *Escherichia coli* quanto para *Staphylococcus aureus*, apresentando halos de inibição na faixa de 12-17 mm. O estudo da liberação mostrou que as Np-Ag foram liberadas apenas em 370 nm. Os perfis de liberação para as temperaturas de 23, 30 e 37°C apresentaram ajuste exponencial satisfatório, seguindo um modelo bimodal. O equilíbrio foi atingido mais rapidamente na temperatura de 23°C, liberando 0,0095 mg/mL de Np-Ag. Nesse sentido, pôde-se inferir que a diminuição da temperatura resultou em maior liberação. Observou-se também que a liberação das Np-Ag seguiu um perfil cinético de ordem zero, para as três temperaturas estudadas. A energia de ativação da liberação (E<sub>L</sub>) entre as temperaturas de 30 e 37°C foi de 67,50 kJ/mol. No mesmo intervalo de temperatura, os parâmetros termodinâmicos para entalpia, entropia e energia livre de Gibbs do complexo ativado, revelaram um processo de natureza endotérmico, com tendência a diminuição da desordem do sistema e naturalmente não espontâneo. Portanto, a partir da utilização de um resíduo agroindustrial de baixo custo, este trabalho contribuiu para a síntese e caracterização do biocompósito FC/Np-Ag, que devido às suas características físico-químicas e antimicrobianas, apresenta grande potencial para atuar no tratamento de feridas.

Palavras-chave: Casca da batata, Celulose, Membrana, Nanopartículas de Prata, Tratamento de Feridas.

# ABSTRACT

LAURITO-FRIEND, D. F **Development of antimicrobial membranes from potato peel cellulose extraction and purification.** Thesis (Doctorate). Federal University of Itajubá (UNIFEI), Itajubá / MG, 2019.

Agroindustrial waste stands out as an abundant and low cost material that can be transformed into value-added products in the medical sector. Researching materials that are even cheaper and more sustainable has become an important task, since wound treatment is a public health problem. Thus, this study aims to develop an innovative “green” technology by isolating cellulose from potato peels to prepare antimicrobial membranes through the use of silver nanoparticle (Np-Ag) biosynthesis, using the geranium leaves extract (*Pelargonium zonale*). The process for extracting and purifying the potato peel cellulose, with consequent film formation, was done using sodium hydroxide (NaOH) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), using factorial design 2<sup>2</sup> in the alkaline pulping stage. Results showed that both concentration and temperature influenced in the yield; however, only temperature was significant enough to form films (membrane). Among the tests a film was obtained. The highest yield occurred under the conditions of 0.5 mol/L NaOH, at 80°C for 2.5h, followed by bleaching with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% w/w. FTIR analysis of this material exhibited characteristic bands of cellulose, while bands related to hemicellulose and lignin were not observed. XRD spectra confirmed that the extracted cellulose had a crystalline pattern similar to type I and II cellulose and the crystallinity index was 73.42%. The membrane thermal behavior revealed that about 80% of the cellulose chain was degraded at temperatures of 340°C and 442°C, with activation energy of 163.82 kJ/mol. Swelling studies showed that membrane has a high swelling content (between 200% and 300%) at temperatures of 10, 25 and 40°C and the diffusion process did not follow the Fick model. In addition, a phase transition temperature of about 40°C was found. Characterization analyzes (UV-visible and FTIR spectra) of the geranium extract exhibited functional chemical groups that are capable of reducing and stabilizing silver ions (Ag<sup>+</sup>) to Np-Ag. This reduction in an aqueous medium with geranium extract was confirmed by the presence of absorption bands typical of the surface plasmon resonance region (RPS) for Np-Ag at 370 and 470 nm. XRD analyses of the cellulose fiber/silver nanoparticle (FC/Np-Ag) biocomposites showed that the crystalline profile of the cellulose matrix was not modified, although crystallinity has decreased to the samples that were swollen in Ag<sup>+</sup> solution. The mean size of the Np-Ag varied between 20-12 nm. Microbiological assays revealed that the antimicrobial activity of Np-Ag was effective for both *Escherichia coli* bacteria and *Staphylococcus aureus*, with inhibition halos in the range of 12-17 mm. Releasing studies showed that the Np-Ag were only released at 370 nm. Release profiles for the temperatures of 23, 30 and 37 ° C exhibited satisfactory exponential adjustments, following a bimodal model. The equilibrium was faster reached at 23°C, releasing 0.0095 mg/mL of Np-Ag. Thus, it could be inferred that temperature decreasing resulted in greater release. It was also observed that the Np-Ag release followed a zero-order kinetic profile for the three temperatures studied. The release activation energy (E<sub>L</sub>) between 30°C and 37°C was 67.50 kJ/mol. In the same temperature range, thermodynamic parameters for enthalpy, entropy and free energy of Gibbs of the activated complex revealed an endothermic process, tending to decrease the system disorder and naturally not spontaneous. Therefore, using a low-cost agroindustrial residue, this study contributed to the synthesis and characterization of the FC/Np-Ag biocomposite, which due to its physic-chemical and antimicrobial characteristics, has great potential in wound treatment.

Key words: Potato Peel, Cellulose, Membrane, Silver Nanoparticles, Wound Treatment.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Planta completa da batata.....	20
Figura 2: Regiões produtoras de batata no Brasil.....	21
Figura 3: Representação esquemática da arquitetura da parede celular vegetal.....	22
Figura 4: Estrutura da celulose formada por unidades consecutivas de celobiose.....	23
Figura 5: Representação das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares das cadeias de celulose.....	23
Figura 6: Regiões cristalinas e amorfas encontradas na fibra celulósica.....	24
Figura 7: Estrutura química de hemicelulose de xilana. (1) 1,4-D-xilopiranoose; (2) L-arabinose; (3) ácido 4-O-D-metil- $\alpha$ -D-glucurônico; (4) grupo acetil.....	25
Figura 8: Unidades de fenilpropano precursoras da lignina. (I) Álcool p-cumarílico; (II) Álcool coniferílico; (III) Álcool sinapílico.....	25
Figura 9: Principais tipos de ligações entre as unidades básicas que constituem a lignina.....	26
Figura 10: Ligações glicosídicas presentes na amilose e amilopectina.....	27
Figura 11: Modificações na estrutura da matriz lignocelulósica após etapas de pré-tratamento.....	28
Figura 12: Reações da lignina em meio básico.....	29
Figura 13: Mecanismo da síntese <i>Bottom up</i> das nanopartículas metálicas.....	37
Figura 14: Principais constituintes do extrato de plantas responsáveis pela bio-redução, crescimento e estabilização das nanopartículas.....	38
Figura 15: Materiais obtidos após ensaios A, B, C e D no planejamento fatorial $2^2$ .....	58
Figura 16: Superfícies de respostas da porcentagem de rendimento (R1) e da formação de filme (R2), para os fatores concentração de NaOH em mol/L (X1) e temperatura em °C (X2), no planejamento fatorial $2^2$ .....	61
Figura 17: Espectros de FTIR da membrana de celulose e da casca da batata e suas principais bandas de absorção.....	62
Figura 18: Perfil TGA/DTGA da casca da batata e da membrana de celulose a 10°C/min.....	64
Figura 19: Perfis de degradação térmica (TGA/DTGA) da membrana de celulose nas taxas de 5, 10 e 15°C/min.....	66

Figura 20: Regressão linear para o cálculo da energia de ativação ( $E_a$ ) da membrana.....	67
Figura 21: Grau de intumescimento (I) da membrana de celulose em soro fisiológico nas temperaturas de 40, 25 e 10°C em relação ao tempo (min).....	69
Figura 22: Imagens obtidas através do MEV da casca da batata (A) e da membrana de celulose (B).....	74
Figura 23: Imagens obtidas através do MEV da casca da batata (A) e da membrana de celulose (B).....	76
Figura 24. UV-vis do extrato aquoso das folhas de gerânio.....	77
Figura 25: Espectros de FTIR do extrato das folhas de gerânio e suas principais bandas de absorção.....	78
Figura 26: Espectros de absorção no UV-visível durante a biossíntese das Np-Ag ao longo do tempo, utilizando extrato de folhas de gerânio ( <i>Pelargonium zonale</i> ) e $\text{AgNO}_3$ (3 mM), a 25°C.....	79
Figura 27: Início da biossíntese das Np-Ag em A (tempo 0 min). Fim da biossíntese das Np-Ag em B (tempo 120 min).....	80
Figura 28: Espectro de absorção no UV-visível de solução de $\text{AgNO}_3$ (3 mM), a 25°C.....	80
Figura 29: Biocompósitos FC/Np-Ag. As amostras foram preparadas após 24 horas de intumescimento no extrato de gerânio e 48 horas intumescidos em solução de 0,001 (B), 0,002 (C), 0,003 (D), 0,004 (E) e 0,005 (F) mol/L de $\text{AgNO}_3$ . Para o branco (A), o intumescimento inicial foi feito com água destilada, seguido de intumescimento em solução de 0,003 mol/L $\text{AgNO}_3$ por 48 horas.....	81
Figura 30: Imagens MEV/EDS da superfície dos biocompósitos FC/Np-Ag. As amostras foram preparadas após 24 horas de intumescimento no extrato de gerânio e 48 horas intumescidos em solução de 0,001 (B), 0,002 (C), 0,003 (D), 0,004 (E) e 0,005 (F) mol/L de $\text{AgNO}_3$ . A imagem (A) corresponde à amostra branco, intumescida em água destilada por 24 horas e depois em solução de $\text{AgNO}_3$ (0,003 mol/L) por 48 horas.....	82
Figura 31: Espectro DRX da membrana de celulose (MC), branco da prata (A) e dos biocompósitos FC/Np-Ag, intumescidos em 0,001 (B), 0,002 (C), 0,003 (D), 0,004 (E) e 0,005 (F) mol/L de $\text{AgNO}_3$ .....	83
Figura 32: Espectro DRX entre 35°-90° da membrana de celulose (MC), branco da prata (A) e dos biocompósitos FC/Np-Ag, intumescidos em 0,001 (B), 0,002 (C), 0,003 (D), 0,004 (E) e 0,005 (F) mol/L de $\text{AgNO}_3$ .....	84

Figura 33: Curva de calibração linear do complexo FC/Np-Ag em meio contendo extrato de gerânio e AgNO <sub>3</sub> 3mM (1:1).....	87
Figura 34: Perfil de liberação das Np-Ag a partir do biocompósito FC/Np-Ag, nas temperaturas de 23, 30 e 37°C.....	88
Figura 35: Regressão linear do ajuste cinético de ordem zero, para os dados de concentração de Np-Ag liberadas em função do tempo, nas temperaturas de 23°C (A), 30°C (B) e 37°C (C).....	90
Figura 36: halos de inibição do crescimento bacteriano para <i>Escherichia coli</i> (A) e <i>Staphylococcus aureus</i> (B) na membrana intumescida no extrato e nos biocompósitos FC/Np-Ag (1, 2, 3, 4 e 5 mM de AgNO <sub>3</sub> ).....	93
Figura 37: Comparação entre as médias dos halos de inibição do crescimento bacteriano obtidos após teste de sensibilidade bacteriana às Np-Ag.....	94
Figura 38: composição morfológica da parede celular das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa (Adaptado de C&EM, 2015).....	95

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Codificação dos níveis para as variáveis NaOH (mol/L) e Temperatura (°C) utilizado no planejamento estatístico $2^2$ .....	44
Tabela 2: Condições do planejamento fatorial $2^2$ com tréplicas.....	45
Tabela 3: Rendimentos segundo a concentração e a temperatura no planejamento fatorial $2^2$ .....	57
Tabela 4: Formação de filme segundo a concentração e a temperatura no planejamento fatorial $2^2$ .....	57
Tabela 5: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste $t$ de Student para o rendimento em um nível de 95% de confiança, segundo planejamento fatorial $2^2$ .....	59
Tabela 6: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste $t$ de Student para a formação de filme em um nível de 95% de confiança, segundo planejamento fatorial $2^2$ .....	59
Tabela 7: Análise de variância (ANOVA) sobre o rendimento, de acordo com a variação de NaOH (mol/L) e temperatura (°C) no planejamento fatorial $2^2$ .....	60
Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) sobre o filme, de acordo com a variação de NaOH (mol/L) e temperatura (°C) no planejamento fatorial $2^2$ .....	60
Tabela 9: Principais eventos térmicos e perdas de massa da casca da batata.....	64
Tabela 10: Principais eventos térmicos e perdas de massa da membrana de celulose.....	64
Tabela 11: Temperaturas dos picos obtidos por DTGA e suas atribuições nas taxas de 5, 10 e 15°C/min.....	67
Tabela 12: Determinação das variáveis para o cálculo da energia de ativação ( $E_a$ ) da membrana.....	67
Tabela 13: Análise de variância de fator único (ANOVA <i>One-Way</i> ) das médias das massas (g) após hidratação da membrana.....	70
Tabela 14. Derivados de celulose sensíveis a temperatura: para temperaturas abaixo da LCST ( $T < LCST$ ), tem-se que a celulose é solúvel em água; para temperaturas superiores a LCST ( $T > LCST$ ), a celulose é insolúvel em água.....	72
Tabela 15: Regressão linear para obtenção dos parâmetros do modelo de Fick ( $n$ , $k$ e $R^2$ ) e para determinação do coeficiente de difusão ( $D$ e $R^2$ ) da membrana de celulose, nas temperaturas de 10, 25 e 40°C.....	73

Tabela 16: Valores comparativos de índice de Miller, ângulo $2\theta$ e distância interplanar (d) da membrana de celulose e da celulose do tipo I e tipo II (FORD <i>et al.</i> , 2010).....	74
Tabela 17: Valores comparativos de índice de Miller, ângulo $2\theta$ , distância interplanar (d) e grau de cristalinidade relativo (C%) da membrana de celulose (MC), branco da prata (A) e dos biocompósitos FC/Np-Ag, intumescidos em 0,001 (B), 0,002 (C), 0,003 (D), 0,004 (E) e 0,005 (F) mol/L de AgNO <sub>3</sub> .....	83
Tabela 18: Valores comparativos do índice de Miller, ângulo $2\theta$ e distância interplanar (d) dos biocompósitos FC/Np-Ag, intumescidos em 0,001 (B), 0,002 (C), 0,003 (D), 0,004 (E) e 0,005 (F) mol/L de AgNO <sub>3</sub> .....	85
Tabela 19: Tamanho das Np-Ag presentes nos biocompósitos FC/Np-Ag, intumescidos em 0,001 (B), 0,002 (C), 0,003 (D), 0,004 (E) e 0,005 (F) mol/L de AgNO <sub>3</sub> .....	86
Tabela 20: Constantes de velocidade (k) e coeficientes de correlação ( $R^2$ ), obtidos após regressão linear do ajuste cinético de ordem zero, realizado no estudo da liberação das Np-Ag em função do tempo e nas temperaturas de 23, 30 e 37°C.....	91
Tabela 21: Parâmetros termodinâmicos da liberação das Np-Ag presentes na membrana de celulose.....	92

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Contexto da produção de batata.....	18
2.2 Composição química da casca da batata.....	20
2.2.1 Celulose.....	21
2.2.2 Hemicelulose.....	22
2.2.3 Lignina.....	23
2.2.4 Amido.....	24
2.3 Extração e Purificação da Celulose.....	26
2.3.1 Reações em meio Alcalino.....	27
2.3.2 Reações com o peróxido de hidrogênio.....	29
2.4 Biomateriais no tratamento de feridas.....	30
2.5 Uso das nanopartículas de prata (Np-Ag) em biomateriais.....	33
2.5.1 Ação Antimicrobiana das Np-Ag.....	33
2.5.2 Síntese e caracterização das Np-Ag.....	34
2.5.3 Np-Ag em celulose.....	38
3. JUSTIFICATIVA.....	40
4. OBJETIVOS.....	40
4.1 Objetivos específicos.....	40
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
5.1 Materiais.....	41
5.2 Metodologia.....	41
5.2.1 Desenvolvimento da membrana a base de celulose.....	41
5.2.2 Efeito da concentração de reagentes e temperatura.....	42
5.2.3 Síntese do biocompósito fibra celulósica/nanopartícula de prata (FC/Np-Ag).....	43
5.3 Técnicas de Caracterização.....	44
5.3.1 Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	44
5.3.2 Análise Termogravimétrica (TGA).....	44
5.3.2.1 Cálculo da Energia de Ativação da degradação térmica.....	45
5.3.3 Determinação do intumescimento da membrana.....	46
5.3.3.1 Estudo do processo de difusão da membrana.....	46

5.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	48
5.3.5 Difração de raios-X (DRX).....	48
5.3.6 Espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-vis).....	49
5.3.6.1 Biossíntese das Np-Ag em meio aquoso .....	49
5.3.6.2 Estudo da liberação das Np-Ag .....	50
5.3.6.3 Cinética da liberação das Np-Ag.....	50
5.3.6.4 Parâmetros termodinâmicos da liberação das Np-Ag.....	51
5.3.7 Teste de sensibilidade bacteriana às Np-Ag.....	54
6. RESULTADOS .....	55
6.1 Obtenção da membrana de celulose.....	55
6.1.2 Estudo fatorial da concentração de reagentes e temperatura .....	55
6.2 Caracterização da membrana a base de celulose.....	60
6.2.1 Análises da estrutura molecular por FTIR .....	60
6.2.2 Análises do comportamento térmico (TGA).....	61
6.2.2.1 Energia de ativação da degradação térmica da membrana.....	64
6.2.3 Estudo do intumescimento da membrana .....	67
6.2.4 Análise da cristalinidade por DRX .....	72
6.2.5 Análises da morfologia (MEV).....	74
6.3 Caracterização do extrato de folhas de gerânio ( <i>Pelargonium zonale</i> ).....	75
6.3.1 Análises por UV-visível e FTIR .....	75
6.3.2 Biossíntese das Np-Ag em meio aquoso .....	77
6.4 Caracterização do biocompósito FC/Np-Ag .....	79
6.4.1 Análises da morfologia (MEV/EDS) .....	79
6.4.2 Análise da microestrutura cristalina (DRX).....	81
6.5 Estudo da liberação das Np-Ag.....	84
6.5.1 Liberação das Np-Ag in vitro.....	84
6.5.2 Cinética da liberação das Np-Ag.....	88
6.5.2 Termodinâmica da liberação das Np-Ag.....	90
6.6 Ensaios microbiológicos .....	91
7. CONCLUSÕES .....	94
8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	96
APÊNDICES .....	109

# 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, pesquisas na área de materiais estão sendo direcionadas para o desenvolvimento de tecnologias “verdes”, que possibilitam o uso de produtos com menor impacto ambiental. Entre tais estudos, destacam-se aqueles que buscam avaliar o uso de fibras naturais para a síntese de materiais biocompatíveis com aplicação na engenharia biológica e biomédica, especialmente na regeneração de tecidos e tratamento de feridas. Somado a isso, sabe-se que no Brasil, assim como em outros países agrícolas, a agroindústria gera inúmeras fontes de biomassa que não são aproveitadas, transformando-se em rejeitos industriais de grande disponibilidade e baixo valor agregado.

No caso do processamento da batata - que se trata do quarto alimento mais disseminado pelo mundo, perdendo apenas para o milho, o arroz e o trigo - a maior parte de seu resíduo encontra-se na forma de casca, comumente destinado à ração animal. Estudos anteriores confirmam que, o uso da celulose extraída da casca da batata representa um bom aditivo de reforço em nanocompósitos (DUFRESNE *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2012). Nesse sentido, as nanofibras de celulose são vistas como boa alternativa para aplicação na área biomédica, pois além de melhorarem as propriedades mecânicas dos materiais (devido à sua alta cristalinidade e fortes interações entre as cadeias) apresentam alta biodegradabilidade e biocompatibilidade, baixa citotoxicidade e grande potencial tecnológico (BRINCHIA *et al.*, 2013; JORFI & FOSTER, 2015).

Sendo o tratamento de feridas um problema de saúde pública, é importante que se busque alternativas cada vez mais baratas e sustentáveis para a cicatrização e regeneração do tecido lesionado. Nas últimas décadas, grande parte dos trabalhos relacionados ao desenvolvimento de curativos biológicos para o tratamento de feridas superficiais reportam o uso da celulose bacteriana (principalmente àquela excretada pelo *Acetobacter xylinum*), como meio adequado para manter a umidade da ferida e ativar fatores de crescimento das células. No entanto, para que o polímero de celulose bacteriano possa suprir a demanda do mercado, faz-se necessário altos custos de produção, tornando seu uso em grande escala economicamente inviável. Logo, a celulose proveniente da biomassa é apontada como boa substituinte à celulose bacteriana, embora sejam necessárias algumas modificações em sua estrutura para que sua aplicação no tratamento de feridas seja eficaz.

Algumas dessas modificações estão relacionadas à introdução das nanopartículas da prata (Np-Ag) na superfície da celulose. É sabido que as Np-Ag potencializam as propriedades

antimicrobianas da prata, eliminando mais de 650 organismos patogênicos, não criando resistência a eles (TIWARI & SOUECEK, 2014). Desta forma, a inserção por via química das Np-Ag nas membranas de celulose impede o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas, favorecendo a prevenção de infecções (BARUD *et al.*, 2011; MANEERUNG *et al.*, 2008).

Embora as Np-Ag possam ser obtidas a partir de métodos físicos e químicos, sua síntese utilizando meios biológicos, como bactérias, fungos e plantas, é vista como alternativa mais ecologicamente viável, pois não faz uso de compostos tóxicos. Neste contexto, a síntese verde ou biossíntese que utiliza extrato de plantas (folhas, caule, frutos, etc), consiste em um dos métodos mais simples para obtenção de grande quantidade de nanopartículas livre de contaminantes, com tamanho e morfologia bem definidos (MITTAL *et al.*, 2013). O processo de redução dos íons  $Ag^+$  a prata metálica ( $Ag^0$ ) ocorre devido à presença de substâncias químicas no extrato, capazes de atuarem como agentes redutores e estabilizantes das nanopartículas formadas. Alguns dos extratos vegetais mais utilizados para a biossíntese das Np-Ag são obtidos a partir de folhas de gerânio, alfafa, aloe vera (babosa), cânfora, capim-limão, etc (RAI, 2013).

Com destaque para o caráter inovador do trabalho, é importante salientar que há poucos relatos de pesquisas na literatura referentes à síntese de membranas celulósicas, oriundas da biomassa, para aplicação no tratamento de feridas. Portanto, a presente proposta de Tese de Doutorado tem como objetivo geral utilizar a casca da batata - um rejeito agroindustrial abundante e de baixo custo – para que esta seja transformada em membrana celulósica e adquira caráter antimicrobiano, através da biossíntese das nanopartículas de prata, em meio de extrato de folhas de gerânio (*Pelargonium zonale*). Logo, ao final deste estudo espera-se contribuir para o desenvolvimento de um biomaterial de origem renovável, capaz de favorecer no processo de cicatrização de feridas, através da síntese e caracterização física, química e microbiológica do biocompósito de Fibra Celulósica/Nanopartícula de prata (FC/Np-Ag).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Contexto da produção de batata

A batata (*Solanum tuberosum*) é uma planta de porte pequeno, perene, com flores brancas, púrpuras ou rosadas, conforme sua variedade. Em sua base (caule), observam-se vários prolongamentos chamados de estolões, cujas extremidades desenvolvem tubérculos comestíveis, ricos em amido (Figura 1). A espécie teve origem no Peru, na região da Cordilheira dos Andes, sendo cultivada por civilizações andinas há mais de 8000 anos. As primeiras sementes de batata foram introduzidas na Europa a partir do século XVI e atualmente, trata-se do quarto alimento mais disseminado pelo mundo, perdendo apenas para o milho, o arroz e o trigo.

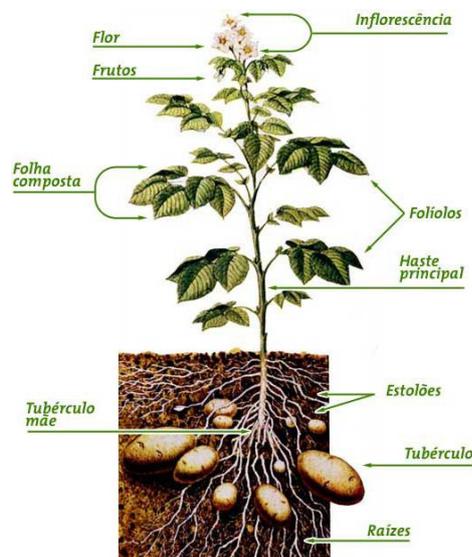


Figura 1: Planta completa da batata (ABBA, 2016<sup>a</sup>).

Em 2013, estima-se que a produção mundial de batata tenha sido de 376 milhões de toneladas, onde os principais países produtores foram a China e a Índia (FAOSTAT, 2016). No Brasil, a batata representa a hortaliça mais cultivada, cuja área plantada corresponde a cerca de 130 mil hectares, gerando valores de aproximadamente, 3,5 milhões de toneladas por ano (IBGE, 2012). Neste contexto, a maior parte da produção nacional de batata encontra-se nas regiões sul e sudeste, totalizando 89% da safra (ABBA, 2015), como ilustrado na Figura 2. Com destaque para o estado de Minas Gerais - o principal estado produtor de batata no Brasil – sua

produção em 2015 alcançou valores em torno de 500 mil toneladas, sendo a região do sul de Minas responsável por cerca de 50% dessa produção (SEAPA, 2015).

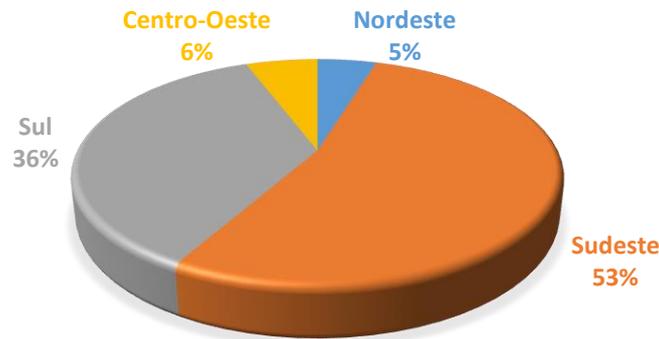


Figura 2: Regiões produtoras de batata no Brasil (Adaptada de ABBA, 2016<sup>b</sup>).

Tratando-se do processamento industrial da batata, os principais resíduos gerados são as cascas (oriundos da etapa de descasque) e podem representar de 6-10% do volume total processado (MADER *et al.*, 2009). Sabendo que no Brasil, 450 mil toneladas de batatas são destinadas às indústrias de chips, palha e pré-fritas congeladas, conseqüentemente, grande quantidade de cascas é gerada sem nenhum valor agregado (SHIMOYAMA, 2014; ARAPOGLOU *et al.*, 2010). Atualmente, o principal destino das cascas de batata descartadas pela agroindústria está relacionado ao seu uso como matéria-prima para ração animal.

Nesse sentido, devido ao crescente apelo ambiental para redução de resíduos, é imprescindível que se invista cada vez mais em tecnologias inovadoras, capazes de reaproveitarem os subprodutos oriundos das indústrias alimentícias. Além disso, pesquisas na área de biomateriais, que viabilizam o uso da casca da batata como fonte de celulose, representam alternativas para o uso desta matéria-prima abundante, de baixo custo e grande potencial tecnológico.

## 2.2 Composição química da casca da batata

Basicamente, as cascas presentes em todos os vegetais possuem a função de proteção mecânica e atuam como barreira natural ao ataque de microrganismos e fungos. Nesse sentido, durante o ciclo evolutivo da parede celular das plantas, observamos o desenvolvimento da parede primária fina (P) e parede secundária espessa (S) (FENGEL&WEGENER, 1989). Tais camadas são revestidas por celulose e hemicelulose, seguida da fase de lignificação ou morte das células (ALÉN *et al.*, 2000). A forte associação entre esses componentes favorece a formação de uma matriz amorfa e rígida, capaz de atuar como mecanismo de defesa na parede das células. Assim, a celulose presente na parede celular encontra-se na forma de fibrilas elementares, revestidas por microfibrilas de hemicelulose e lignina, como esquematizado na Figura 3 (ZHANG & LYND, 2004).

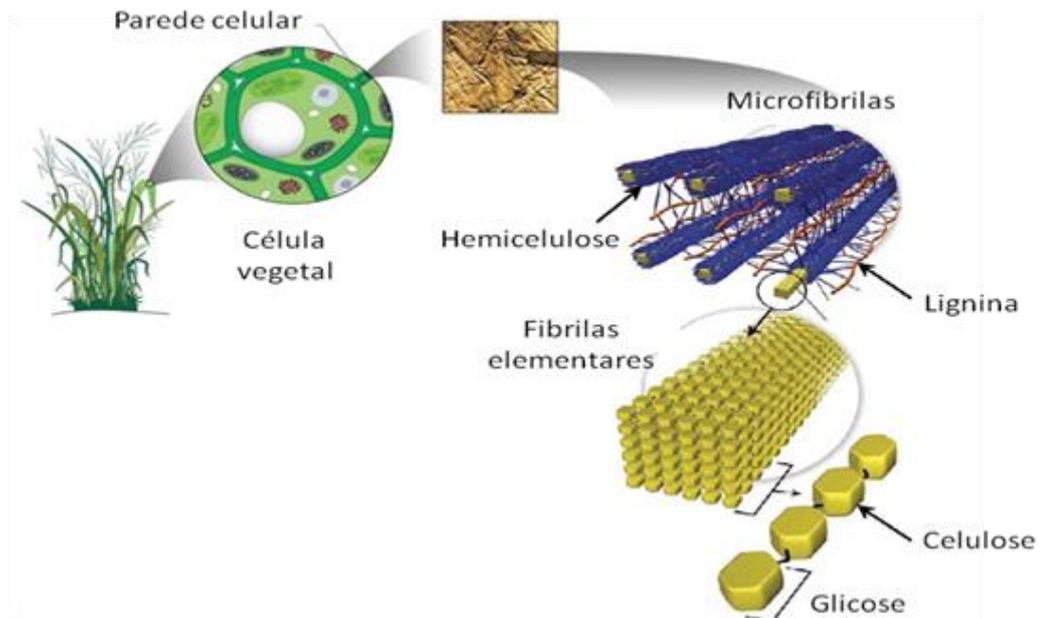


Figura 3: Representação esquemática da arquitetura da parede celular vegetal (Adaptada de GENOMICS, 2016).

No caso das cascas da batata, seu principal componente, além de celulose, hemicelulose e lignina, é o amido (ARAPOGLOU *et al.*, 2010). Conforme reportado por Camire e colaboradores (1997), cascas de batata secas possuem 25% de amido, 30% de polissacarídeos não-amiláceos – como celulose e hemicelulose - 20% de lignina, 18% de proteínas, 1% de lipídios e 6% de cinzas. A seguir, serão detalhados os quatro elementos mais importantes presentes nas cascas de batata.

## 2.2.1 Celulose

A celulose é o polímero natural mais abundante do planeta, podendo ser encontrada na parede celular de todas as plantas, além de ser sintetizada por algumas amebas, animais marinhos, bactérias e fungos (SIQUEIRA *et al.*, 2010). Trata-se de um homopolissacarídeo linear de  $\beta$  (1,4) D – anidroglicose, cujo grau de polimerização (*degree of polymerization* - DP) é alto, na faixa de 7000-15.000 unidades (SJOSTROM, 1993). Nesse sentido, a unidade repetitiva da cadeia de celulose – a celobiose (Figura 4) – é formada quando duas moléculas de glicose se unem nos carbonos 1 e 4 e eliminam uma molécula de água, através de seus grupos hidroxílicos (FENGEL & WEGENER, 1989).

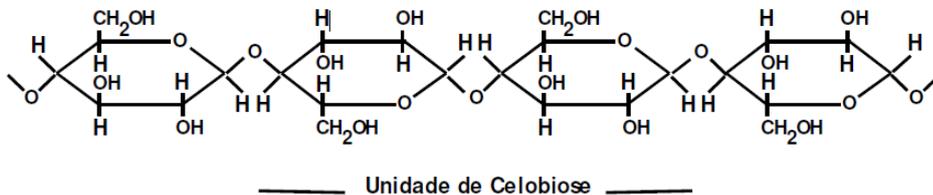


Figura 4: Estrutura da celulose formada por unidades consecutivas de celobiose (FENGEL & WEGENER, 1989).

Cada unidade repetitiva da celulose possui seis grupos hidroxilas, responsáveis pelas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, presentes nas cadeias (Figura 5) (GURUNATHAN *et al.*, 2015).

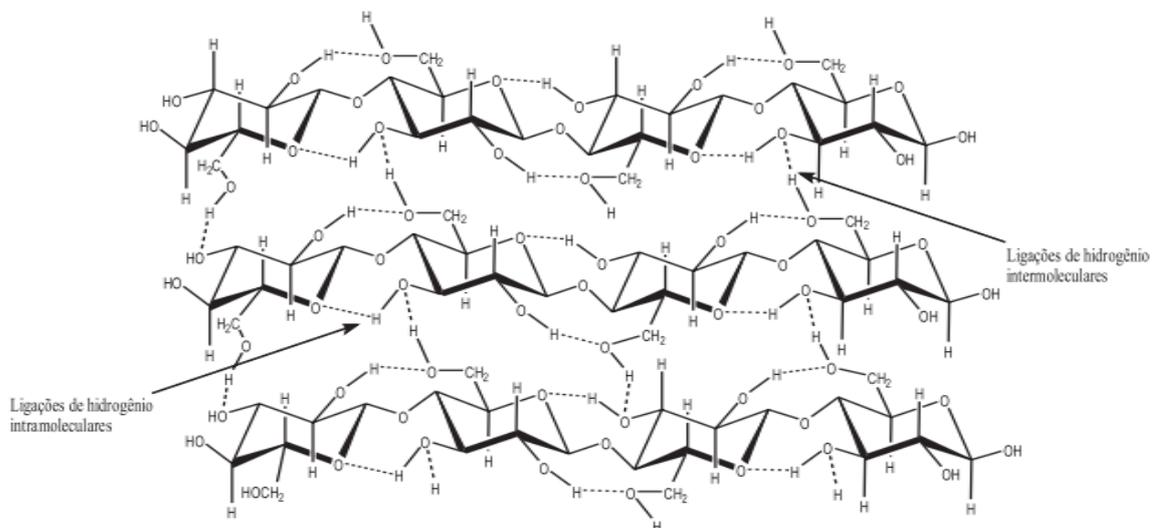


Figura 5: Representação das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares das cadeias de celulose (SANTOS *et al.*, 2012).

Esta configuração, além de conferir o caráter hidrofílico da celulose, também é responsável pelo empacotamento das cadeias na forma de microfibrilas e fibrilas elementares, resultando em sua estrutura cristalina (SJOSTROM, 1993). Desta forma, a organização da fibra celulósica está dividida em regiões altamente ordenadas – cristalinas – e regiões menos ordenadas – amorfas (Figura 6).

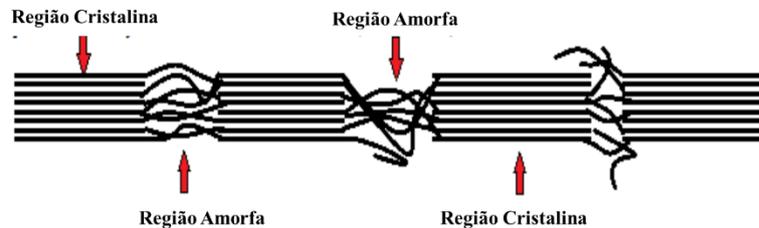


Figura 6: Regiões cristalinas e amorfas encontradas na fibra celulósica (Adaptada de CHEN, 2011).

Portanto, características da celulose, como: alto grau de polimerização e fortes interações entre as cadeias, conferem a este polímero, além de cristalinidade, resistência a altas temperaturas, boas propriedades mecânicas e certa estabilidade química, principalmente em meio básico e na presença de agentes oxidantes (HENRIKSSON *et al.*, 2009<sup>a</sup>; JOHN & THOMAS, 2008).

### 2.2.2 Hemicelulose

Depois da celulose, a hemicelulose é o segundo material orgânico mais abundante e atua na parede celular como uma interface entre celulose e lignina, facilitando a incrustação entre as fibras (GURUNATHAN *et al.*, 2015; TELEMAN *et al.*, 2009). Por ser um heteropolissacarídeo ramificado, sua cadeia principal pode ser formada por hexoses (glicose, manose e galactose) ou pentoses (xilose e arabinose), enquanto que as ramificações consistem em grupos acetil e ácidos glucorônicos (FENGEL & WEGENER, 1989). A Figura 7 ilustra um exemplo da hemicelulose de xilana, cujo tipo é o mais encontrado na natureza.

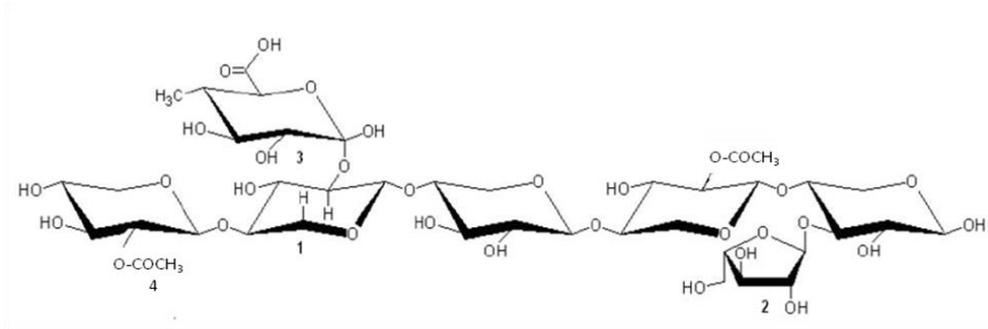


Figura 7: Estrutura química de hemicelulose de xilana. (1) 1,4-D-xilopiranosse; (2) L-arabinose; (3) ácido 4-O-D-metil- $\alpha$ -D-glucurônico; (4) grupo acetil (PITARELO, 2007).

A hemicelulose difere da celulose em três importantes aspectos: presença de diferentes tipos de açúcares na cadeia principal; ausência de cristalinidade devido às ramificações e baixo grau de polimerização (DP de 50-300) (JOHN & THOMAS, 2008). Tais características justificam porque a hemicelulose é menos estável térmica e quimicamente, quando comparada com a celulose (TELEMAN *et al.*, 2009).

### 2.2.3 Lignina

A lignina é um polímero amorfo, hidrofóbico e complexo que difere consideravelmente dos outros componentes da parede vegetal (JOHN & THOMAS, 2008). Sua estrutura química é composta por unidades de fenilpropano, sendo polimerizada a partir de três álcoois precursores: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 8) (FENGEL & WEGENER, 1989).

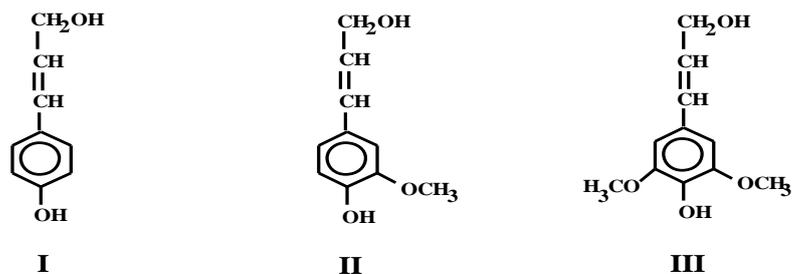


Figura 8: Unidades de fenilpropano precursoras da lignina. (I) Álcool p-cumarílico; (II) Álcool coniferílico; (III) Álcool sinapílico (FENGEL & WEGENER, 1989).

Na estrutura tridimensional da lignina, as unidades fenilpropano são acopladas por ligações éter (C-O-C) e ligações carbono-carbono (C-C), com destaque para as do tipo  $\alpha$ -O-4,  $\beta$ -O-4,  $\gamma$ -O-4, 5-O-4 e 5-5,  $\beta$ -5,  $\beta$ - $\beta$ ,  $\beta$ -1, respectivamente (Figura 9) (ALÉN *et al.*, 2000).

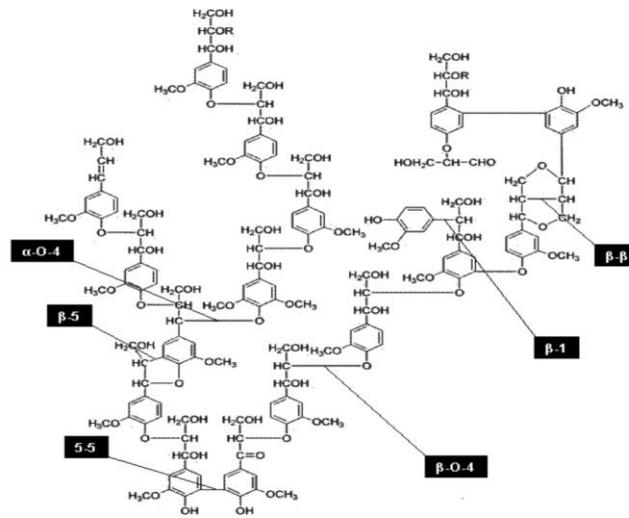


Figura 9: Principais tipos de ligações entre as unidades básicas que constituem a lignina (CARVALHO *et al.*, 2009).

A partir da estrutura extremamente compacta da lignina, suas principais funções na parede celular das plantas são: conferir rigidez e suporte mecânico; atuar como componente adesivo nos tecidos vegetais; favorecer o transporte de água e nutrientes, devido ao seu caráter hidrofóbico; e auxiliar como mecanismo de defesa ao ataque de microrganismos e fotodegradação (HENRIKSSON *et al.*, 2009<sup>b</sup>). Outras características da lignina incluem o fato de ser solúvel em meio básico a altas temperaturas e ser facilmente oxidada (BISMARCK *et al.*, 2005).

### 2.2.4 Amido

O amido é um importante polissacarídeo de reserva presente em plantas superiores, fornecendo de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem (COUTINHO, 2007). É formado por unidades repetitivas de  $\alpha$ -D-anidroglicose, que se organizam em cadeias lineares (amilose) e ramificadas (amilopectina) para comporem os grânulos de amido. Sua composição varia em torno de 20-30% de amilose e 70-80% de amilopectina, conforme a espécie da planta (GURUNATHAN *et al.*, 2015).

As principais ligações que unem os resíduos de glicose na molécula de amilose são as ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4), enquanto que na amilopectina - além das ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) - observam-se ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) nos pontos de ramificações (Figura 10) (LEHNINGER *et al.*, 2000).

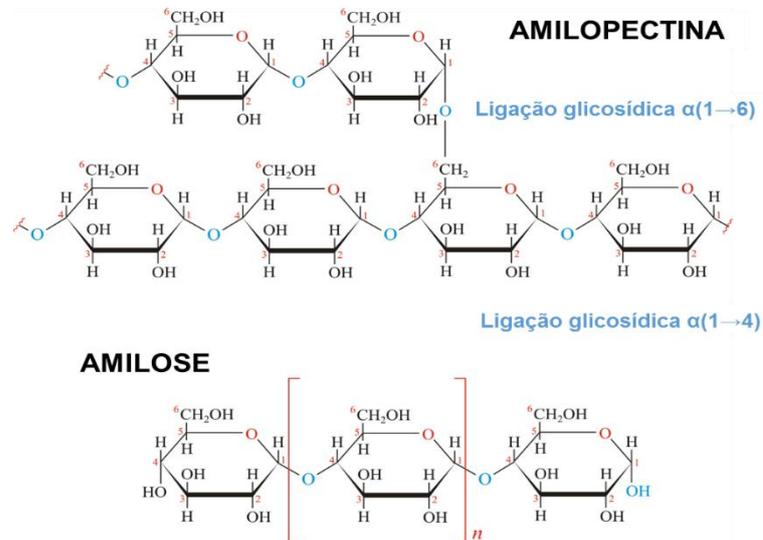


Figura 10: Ligações glicosídicas presentes na amilose e amilopectina (Adaptada de CHEMISTRY GLOSSARY, 2016).

Tais ligações do tipo  $\alpha$  no amido, marcam uma importante diferença com a macromolécula de celulose, cujas principais ligações entre os monômeros são ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Somado a isso, as ligações  $\alpha$  permitem a flexibilidade do amido e garantem sua digestão pelos seres humanos (LEHNINGER *et al.*, 2000).

A cristalinidade dos grânulos de amido está relacionada, sobretudo, à presença de amilose, enquanto que nas regiões amorfas observam-se ramificações e amilopectina (PARKER & RING, 2001). No entanto, em presença de aquecimento e água, a estrutura cristalina é rompida, separando as cadeias de amilopectina e, posteriormente, de amilose na forma de pasta viscosa. No caso para o amido proveniente da batata, a temperatura de gelatinização está entre 56-66°C (CIACCO & CRUZ, 1982).

## 2.3 Extração e Purificação da Celulose

Sabendo que na parede celular das plantas, a celulose se encontra na forma de fibrilas elementares embebidas em uma matriz lignocelulósica composta por hemicelulose e lignina, sua extração e purificação requer uma série de pré-tratamentos, de modo a alterar/romper a rígida estrutura da biomassa (Figura 11) (MOSIER *et al.*, 2005; AGBOR *et al.*, 2011).

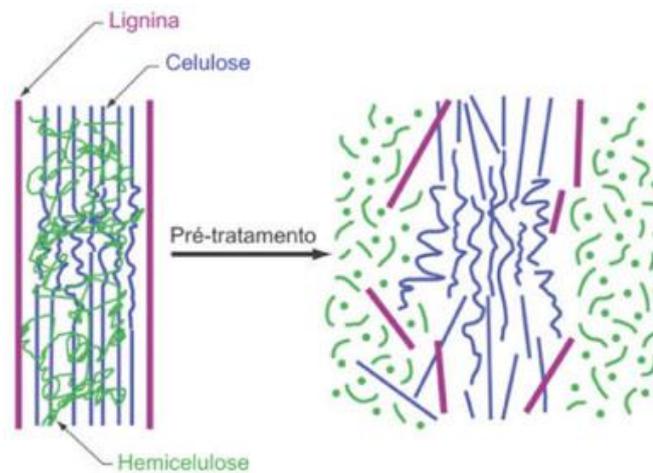


Figura 11: Modificações na estrutura da matriz lignocelulósica após etapas de pré-tratamento (SANTOS *et al.*, 2012).

Os diferentes tipos de pré-tratamento podem envolver métodos físicos (moagem, trituração, aquecimento), químicos (reações em meio ácido, básico ou na presença de agentes oxidantes), físico-químicos (explosão a vapor, radiação micro-ondas), biológicos (utilização de fungos que degradam, principalmente, a lignina) ou a combinação deles, de acordo com o nível de separação desejado entre os componentes da biomassa (KUMAR *et al.*, 2009; ROSA, 2012).

Dentre os muitos tipos de pré-tratamento citados na literatura, a polpação alcalina com hidróxido de sódio é bastante estudada, pois além de ser economicamente viável, representa uma boa alternativa para matérias-primas com baixo teor de lignina, como resíduos agroindustriais (AGBOR *et al.*, 2011). Além disso, quando comparado com outras tecnologias, o processo alcalino utiliza temperaturas e pressões mais baixas (RAVEENDRAN *et al.*, 2015). Tratando-se especificamente das reações em meio ácido, o pré-tratamento alcalino é preferível devido à maior solubilização da lignina e menor degradação da celulose durante o processo (ALVIRA *et al.*, 2010). Logo, o processo alcalino é destacadamente um dos mais utilizados

para a produção de polpa celulósica de elevada qualidade, pois é capaz de separar as fibras e degradar lignina seletivamente, sem destruir a celulose (FERNANDÉZ, 2010).

### 2.3.1 Reações em meio Alcalino

As modificações na biomassa decorrentes do tratamento alcalino, relacionam-se: ao inchaço e enfraquecimento da fibra; à quebra das ligações entre a lignina e os carboidratos; à solubilização da lignina; à diminuição do grau de polimerização, em especial para a hemicelulose; e à parcial perda de cristalinidade (SUN & CHENG, 2002). Desta forma, o que se observa após o tratamento com álcalis – como, hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), hidróxido de potássio (KOH) e hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) – é a formação de um resíduo insolúvel enriquecido com polissacarídeos (principalmente celulose), devido à dissolução da lignina (LAURITO-FRIEND, 2013; RAVEENDRAN *et al.*, 2015).

O mecanismo envolvido no pré-tratamento alcalino consiste, inicialmente, na hidratação da fibra e saponificação dos grupos éster, presentes na hemicelulose e responsáveis pelas ligações com outros componentes, como a lignina (SUN & CHENG, 2002). Tais reações justificam parte da perda de rendimento após o tratamento com íons hidróxido, pois a hemicelulose é um componente relativamente exposto na estrutura da matriz lignocelulósica e não apresenta caráter cristalino (FENGEL & WEGENER, 1989). Somado a isso, a temperaturas superiores a  $100^\circ\text{C}$ , também se observam reações de “peeling” e hidrólise alcalina nas ligações glicosídicas encontradas em ambos os polissacarídeos, com conseqüente diminuição de suas massas molares (FENGEL & WEGENER, 1989).

As principais reações de fragmentação da lignina em meio básico, com conseqüente liberação de compostos solúveis no meio racional, ocorrem através da desprotonação do OH fenólico e formação de metileno quinona pela clivagem do carbono alfa (Figura 12) (FENGEL & WEGENER, 1989).

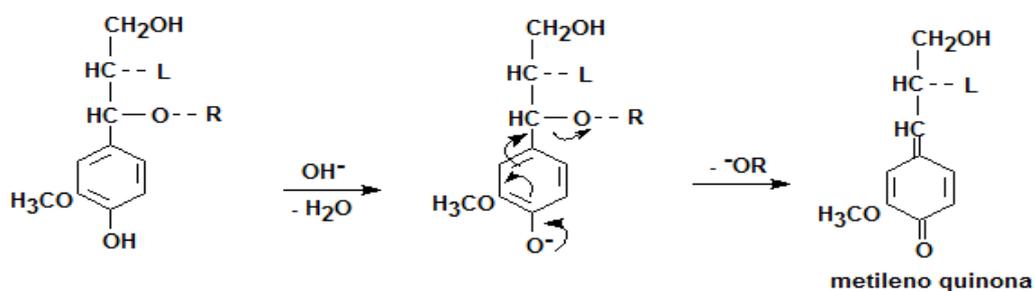


Figura 12: Reações da lignina em meio básico (SJOSTROM, 1993).

Estudos realizados na presença de íons hidróxido sugerem que este tratamento é apropriado para a extração da celulose, proveniente de resíduos agroindustriais. Por esta razão, mudanças na estrutura físico-química do bagaço de cana de açúcar foram observadas por Janu e colaboradores (2011), após tratamento com 3% de NaOH, a 121°C, por 60 minutos. Conforme reportado pelos autores, o pré-tratamento com NaOH foi responsável por reduzir 82% da lignina no bagaço. Desta forma, análises por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) confirmaram a remoção deste componente, devido à diminuição da transmitância no pico em 1590 cm<sup>-1</sup>, correspondente ao anel aromático. Além disso, também foi observado enfraquecimento da banda de carbonila em 1735 cm<sup>-1</sup>, que implica remoção da hemicelulose. Tratando-se das imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV), os autores apontaram que o pré-tratamento alcalino modificou a estrutura rígida e compacta das fibras, gerando um material com maior superfície de contato e porosidade, principalmente por efeito da ruptura do complexo lignina-carboidratos.

Pesquisas conduzidas por Ham *et al* (2012), demonstram que o conteúdo de celulose presente na palha de trigo após tratamento com 1% de NaOH (a 121°C, por 1,5h) foi de 57,33%, e que os valores obtidos para hemicelulose e lignina foram de 14,33 e 11,7%, respectivamente. Desta forma, os autores verificaram que o conteúdo de celulose no material aumentou em 44,52%, enquanto que diminuiu em 44,15% para hemicelulose e 42,45% para a lignina. A remoção destes componentes foi confirmada por meio de análises estruturais no FTIR das amostras *in natura* e pré-tratadas. Logo, através de espectros no infravermelho, observou-se enfraquecimento dos picos característicos da hemicelulose e lignina, situados na faixa de 1300-1400 cm<sup>-1</sup> (referentes às ligações C-O-C) e 1500-1600 cm<sup>-1</sup> (devido, principalmente, à presença de anel aromático).

Nesse sentido, o tratamento da biomassa em meio básico é eficiente no processo de isolamento da celulose, devido à dissolução de grandes quantidades de lignina e hemicelulose. No entanto, em condições mais severas, como altas concentrações de NaOH e temperaturas superiores a 150°C, também é possível observar perdas de celulose (CHEN *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2014). Logo, faz-se necessário um balanço entre os parâmetros do pré-tratamento com o tipo e a quantidade dos componentes a serem removidos da biomassa, de modo a obter-se bons rendimentos do material desejado.

### 2.3.2 Reações com o peróxido de hidrogênio

Etapas subsequentes à extração alcalina da celulose são necessárias para garantir a completa remoção da lignina, entre outros compostos cromóforos, para a purificação da polpa (SOUZA, 2015). Os processos tradicionais de branqueamento das polpas celulósicas envolvem o uso de agentes químicos clorados, como o cloro ( $\text{Cl}_2$ ), dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) e o hipoclorito de sódio ( $\text{NaClO}$ ). No entanto, sabe-se que o uso destes reagentes gera substâncias organocloradas de elevada toxicidade para o ambiente, como dioxinas e furanos (ROSA, 2012). Nesse sentido, buscando-se soluções “mais limpas” para o processo de purificação da celulose proveniente de materiais lignocelulósicos, o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é visto como boa alternativa, pois além de representar um ótimo agente oxidante ( $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $E_{\text{red}} = 1,77 \text{ V}$ ) e redutor ( $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{OH}^- \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^-$ ,  $E_{\text{oxi}} = -0,15 \text{ V}$ ), quando decomposto no meio reacional gera, basicamente, água e oxigênio, de acordo com a reação 1 (MATTOS *et al.*, 2003):



Em soluções concentradas, o calor liberado pela reação de decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode elevar a temperatura e aumentar a taxa de decomposição deste reagente. Segundo Mattos *et al.* (2003), para cada incremento de  $10^\circ\text{C}$ , a taxa de decomposição do peróxido pode aumentar até 2,5 vezes, aproximadamente.

Além da temperatura, o pH da reação também pode interferir na decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de acordo com o tipo de íons presentes no meio. Em pH alcalino, a espécie ativa formada é o ânion hidroperóxido ( $\text{HOO}^-$ ), que pode vir a reagir com  $\text{H}_2\text{O}_2$  não dissociado para formar radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e o radical superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) (RABELO, 2007). Por sua vez, em meio ácido, a espécie mais presente é o radical hidroperóxido ( $\text{HOO}\cdot$ ) (LEE, 2002). Logo, em ambos os casos e na presença de biomassa, o que se observa é o ataque eletrofílico/nucleofílico das espécies ativas disponíveis no meio reacional com a lignina residual, resultando na degradação deste componente.

Avaliando-se a quantidade de reagente utilizado, Higa e colaboradores (2012) verificaram o uso do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , nas concentrações de 5, 7 e 9%, no bagaço de cana deslignificado com 9% de  $\text{NaOH}$ , por 3 horas, a  $130^\circ\text{C}$ . Os testes demonstraram que na maior concentração de peróxido, houve, praticamente, remoção de toda a lignina residual, resultando apenas cerca

de 0,8% deste componente na polpa. No entanto, nestas mesmas condições também foi observado perda de 2% de celulose em relação ao ensaio com concentração intermediária. Nesse sentido, os autores sugerem que o ensaio com 7% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a 25°C, pH 11,5, por 1h) é o mais satisfatório para a etapa de purificação da celulose, já que a lignina residual foi de aproximadamente 0,9% e o rendimento de celulose foi de 92,1%.

Em outro trabalho reportado por Souza (2015), avaliou-se a extração e purificação de celulose proveniente de amostras de sabugo de milho, através de reações com NaOH (1M, 4h e a 80°C) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5%, 3h e a 30°C), em etapas separadas. Ao final do processo grande parte da hemicelulose e da lignina foram removidas – com rendimentos finais de 4,1 e 1,2%, respectivamente – enquanto que o percentual de celulose nas fibras aumentou para 90%. Segundo o autor, tais resultados foram satisfatórios para a obtenção de um material rico em celulose e ideal para futuros experimentos visando à obtenção de celulose nanocristalina.

De modo geral, o uso do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em etapas posteriores à deslignificação de resíduos agroindustriais é imprescindível para se obter um material mais purificado, com alta concentração de celulose, sem que haja formação de compostos nocivos para o meio ambiente.

## **2.4 Biomateriais no tratamento de feridas**

Entende-se por feridas qualquer interrupção no tecido corpóreo, que pode ser ocasionado por uma lesão ou trauma, afetando sua integridade. A classificação das feridas é feita quanto à sua causa, conteúdo microbiano, tipo de cicatrização, grau de abertura e tempo de duração (SANTOS *et al.*, 2013). O processo de cicatrização é comum para todos os tipos de feridas e envolve uma sequência de etapas coordenadas em cascata, como: hemóstase (coagulação), inflamação, proliferação celular, contração da ferida e remodelação do tecido lesionado (AHAMED *et al.*, 2015). Desta forma, ao final de tais eventos bioquímicos, o que se observa é a reconstituição da área machucada, devido ao reestabelecimento da pele, de modo que a velocidade de cura vai depender do tipo de ferida e da saúde do organismo envolvido (CAMPOS *et al.*, 2007).

Para facilitar o processo do tratamento das feridas, os curativos atuam como um meio terapêutico capaz de limpar, proteger e isolar o tecido lesionado de agentes exteriores, além de absorver secreções (exsudato) e facilitar a cicatrização (SMANIOTTO *et al.*, 2010). Sua classificação é feita em três categorias: curativos passivos, que são utilizados apenas para cobrir a ferida; curativos interativos, que favorecem a cicatrização (absorvendo exsudato, por

exemplo); e curativos ativos, que contém agentes biológicos e/ou propriedades antimicrobianas, capazes de atuarem no mecanismo de cura (ARUNKUMAR, 2017). Portanto, um curativo ideal, além de manter a umidade local, também precisa apresentar: boa resistência mecânica, elasticidade, capacidade para modelar-se à região lesionada, biodegradabilidade, inibição do crescimento bacteriano e ausência de toxicidade ao organismo (POWELL et al., 2016).

No mercado mundial há diversos materiais (sintéticos ou naturais) utilizados no tratamento de feridas, cujo mecanismo de ação pode agir através da: higienização, coagulação, desbridamento (remoção do tecido morto ou qualquer corpo estranho presente na ferida), desinfecção, controle do exsudato e/ou estímulo à granulação (cicatrização) (SMANIOTTO *et al.*, 2010). Alguns exemplos já conhecidos na literatura são os curativos a base de quitina, quitosana, colágeno e celulose bacteriana, entre outros de origem renovável (JORFI & FOSTER, 2015; MORAES *et al.*, 2016; TAMURA *et al.*, 2011; AHAMED *et al.*, 2016). Tais materiais possuem em comum o fato de serem biocompatíveis e biodegradáveis, que são características biológicas extremamente necessárias para o desenvolvimento de biomateriais na área médica.

A celulose bacteriana já vem sendo utilizada para o tratamento de feridas desde as décadas de 80-90, sendo disponibilizada comercialmente como XCell® (Johnson & Johnson) e Biofl® (Fibrocel, Brasil). Este material apresenta vantagens em relação a outros biopolímeros, pois além de possuir uma estrutura única e livre de impurezas (hemicelulose e lignina), possibilita um meio com alta umidade, favorecendo a cicatrização e regeneração do tecido (HOENICH, 2016; MORAES *et al.*, 2016).

Estudos feitos por Czaja e colaboradores (2007) demonstraram que o uso da celulose bacteriana (CB) em pacientes com queimaduras de segundo grau foi capaz de reduzir a dor e acelerar o processo de cura, quando comparado a outros materiais. Segundo os autores, o bom desempenho da CB relaciona-se, principalmente, a algumas de suas propriedades, como: alta capacidade para se moldar ao contorno da ferida e elevada hidrofiliabilidade, necessária para a reconstrução do tecido e alívio da dor. Outras pesquisas conduzidas por Fu *et al.* (2013), com ratos, confirmaram que o uso da CB é realmente mais eficiente na regeneração dos tecidos e melhorias no tratamento de feridas, reduzindo as respostas inflamatórias.

Em trabalho mais recente, Kwak *et al.* (2015) verificaram os efeitos da CB quando aplicada no tratamento de queimaduras em ratos, por 15 dias. De acordo com a avaliação da regeneração da pele e do crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese), os autores notaram que o uso de CB acelera o processo de tratamento das feridas, pois atua como um

arcabouço para a proliferação celular, favorecendo a expressão de colágeno e regulação da angiogênese. Além disso, também foi reportado que a CB não induziu toxicidade específica ao fígado e rins dos animais.

Embora a celulose bacteriana seja um excelente material a ser aplicado na engenharia de tecidos, sua baixa disponibilidade e elevados custos de fermentação ainda representam barreiras para o uso em larga escala. Nesse sentido, a celulose oriunda de materiais lignocelulósicos representa uma boa alternativa à celulose bacteriana, já que pode ser obtida a partir de fontes renováveis de baixo custo (resíduos agroindustriais) e existe em grande quantidade.

Conforme Chinga-Carrasco e Syverud (2014), fibras de celulose provenientes de plantas representam um material promissor para o tratamento de feridas, pois além de formarem estruturas tridimensionais micro porosas – que favorecem o transporte de células, antibióticos, etc - sua constituição química é rica em OH, permitindo a absorção do excesso de exsudato e ao mesmo tempo promovendo um ambiente úmido ao redor da ferida, que ajuda no processo de cicatrização. Nesse sentido, em pesquisas conduzidas por Hakkaarainen e colaboradores (2016), investigou-se o potencial da celulose nanofibrilada obtida da madeira, como curativo no tratamento de queimaduras em pacientes, após enxerto de pele. Os testes revelaram que o material apresentou boa performance devido à algumas de suas principais características, como: alta habilidade em absorver fluidos; boa adesão à ferida; e facilidade em desprender-se do local afetado, após período de regeneração da pele. Somado a isso, o curativo de celulose nanofibrilada não causou reações adversas aos pacientes, revelando ser um material altamente biocompatível.

Estudos reportados por Nordli *et al.* (2016) indicam que a celulose de origem vegetal não apresenta toxicidade às células. Desta forma, os autores avaliaram a citotoxicidade de nanofibras de celulose com elevado grau de pureza, obtidas a partir do pré-tratamento da madeira com hidróxido de sódio, seguido de oxidação com N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO). Através de testes citotóxicos realizados com células cutâneas humanas (fibroblastos e queratinócitos epidérmicos), foi observado que o material obtido é tão seguro quanto o curativo AquaCel®, apresentando baixos níveis de toxinas (< 50 unid. endotoxina/g de celulose). Além disso, ressaltou-se que os resultados de toxicidade, associados à alta capacidade de absorção de água das fibras, fazem deste material um forte candidato para aplicação no tratamento de feridas.

De modo geral, ainda que o mercado atual ofereça grande quantidade de tecnologias relacionadas à cicatrização e aos curativos, muito há de se estudar, para que biomateriais cada vez mais eficientes, simples e baratos possam contribuir para o tratamento de feridas, principalmente quando se leva em consideração que grande parte das inovações deste setor são provenientes de outros países (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

## **2.5 Uso das nanopartículas de prata (Np-Ag) em biomateriais**

### **2.5.1 Ação Antimicrobiana das Np-Ag**

Sabe-se que na Idade Média, pacientes com doenças venéreas eram tratados com solução de nitrato de prata e que no século XIX, o mesmo composto químico era utilizado em feridas, de modo a favorecer a cicatrização. Nesse sentido, desde muito tempo, a prata tem sido usada na forma de íons metálicos ( $\text{Ag}^+$ ), nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e sulfadiazina de prata para o tratamento de queimaduras, feridas, entre outras infecções (RAI *et al.*, 2009). Embora a utilização da prata em infecções bacterianas tenha diminuído após o surgimento de antibióticos, recentemente, com o aumento de bactérias cada vez mais resistentes a estes medicamentos, o uso de derivados da prata como agente antimicrobiano vem despertando cada vez mais interesse na comunidade científica (CABALA, 2013).

Nos últimos anos, com o advento da nanotecnologia, nanopartículas de prata (Np-Ag) na faixa de 1-100 nm estão sendo incorporadas em biomateriais, devido à sua elevada área superficial, em contraste ao seu pequeno volume, que potencializa a ação da prata contra os microrganismos (MANEERUNG *et al.*, 2008). Nesse sentido, há registros na literatura de que as Np-Ag podem inibir o crescimento de vários organismos patogênicos, como *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis*, *Neustria gonorrhoea*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc (LI *et al.*, 2015; FERNANDES, 2014).

Tratando-se especificamente dos materiais destinados ao tratamento de feridas, pesquisas comprovam que curativos, cremes e géis contendo Np-Ag são capazes de impedir infecções bacterianas em feridas agudas e crônicas (LEAPER, 2006). Logo, conforme observado por Tian *et al.* (2007) após experimentação com ratos, a introdução de Np-Ag em feridas causadas por queimaduras foi capaz de auxiliar no processo de cicatrização, melhorando a aparência da região lesionada e impedindo inflamações. Além disso, em estudo proposto por Abboud e colaboradores (2014), pacientes em período pós-operatório que foram tratados com

curativos a base de prata e nylon reportaram menos dor, quando comparados com o grupo que recebeu curativos convencionais feitos de gaze.

Para avaliar a ação de alguns materiais disponíveis no mercado contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, Castellano *et al.* (2007) compararam oito curativos a base de prata (Acticoat® 7, Acticoat® Moisture Control, Acticoat® Absorbent, Silvercel™, Aquacel® Ag, Contreet® F, Urgotol® SSD e Actisorb®) com três cremes antimicrobianos (Silvadene®, Sulfamylon®, Sulfato de gentamicina - Fougere) e um gel antimicrobiano a base de prata (Silvasorb®). Os resultados demonstraram que todos os materiais testados apresentaram atividade antimicrobiana. Entre os curativos a base de prata, Contreet® F e Acticoat® foram os que mais inibiram microrganismos. Entretanto, comparando-se os cremes e o gel com os curativos, os dois primeiros exibiram melhores propriedades bactericidas, eliminando praticamente todo o crescimento bacteriano em 24 horas. Em vista disso, os autores enfatizam a importância de se escolher o melhor agente tópico de acordo com o tipo de ferida infectada.

Ainda que o efeito antimicrobiano da prata seja historicamente conhecido e já aplicado na área médica, odontológica, têxtil, tratamento de águas (etc), seu mecanismo de ação ainda não é totalmente compreendido (DURAN *et al.*, 2007). Como os íons  $Ag^+$  apresentam tendência para se complexar com substâncias contendo enxofre e fósforo, acredita-se que as Np-Ag atuem na membrana da parede celular dos microrganismos, causando danos ao processo de respiração e à permeabilidade da membrana, com consequente morte das células, por meio da destruição do DNA (LI *et al.*, 2008; FERNANDES, 2014). Felizmente, o efeito nocivo das Np-Ag parece estar restrito aos microrganismos, já que em pequenas quantidades, muitos estudos sugerem que as Np-Ag não representam toxicidade aos seres humanos (RAI *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2015).

### **2.5.2 Síntese e caracterização das Np-Ag**

A produção de nanopartículas pode ser classificada a partir de dois métodos: *top down*, que utiliza a abordagem de “macro para micro” e *bottom up*, que consiste na obtenção de nanopartículas a partir de um processo hierarquizado. Na síntese *top down*, as nanopartículas são produzidas utilizando-se métodos físicos e químicos, capazes de reduzirem o tamanho de um material de partida adequado; entretanto, este método tem como desvantagem a geração de imperfeições na superfície do produto (MITTAL *et al.*, 2013). Na síntese *bottom up*, por sua vez, as nanopartículas são preparadas mediante redução do íon  $M^+$  ao seu metal correspondente

$M^0$  - em meio aquoso previamente selecionado - com consequente crescimento e estabilização das nanopartículas (Figura 13). Nesse sentido, é necessário escolher a técnica que melhor se adeque ao resultado esperado, pois as propriedades físicas e químicas das nanopartículas são fortemente influenciadas pelas condições experimentais.

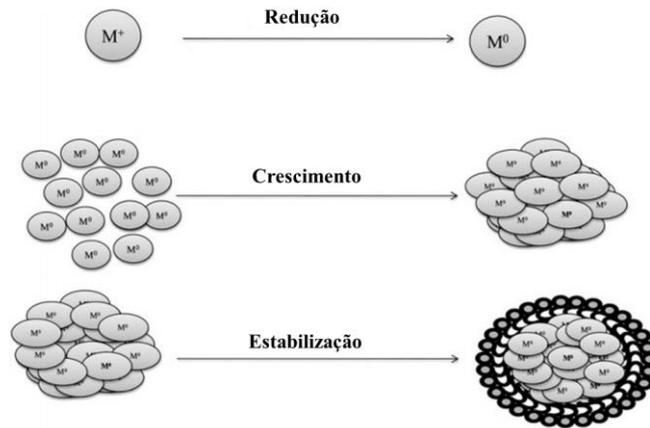


Figura 13: Mecanismo da síntese *Bottom up* das nanopartículas metálicas (Adaptada de MITTAL *et al.*, 2013).

Usualmente, métodos *Bottom up*, como redução química/fotoquímica e técnicas eletroquímicas, são os processos mais utilizados para a síntese e estabilização das nanopartículas de metais (SHARMA *et al.*, 2009). No entanto, como estes processos utilizam rotas sintéticas envolvendo compostos tóxicos para o meio ambiente, a síntese verde ou biossíntese - que faz uso de sistemas biológicos para a redução da prata - é vista como alternativa mais “limpa” e ecologicamente mais aceitável para a preparação das Np-Ag (SILVA, 2014).

A biossíntese *bottom up* de nanopartículas a partir de extrato de folhas, além de apresentar grande disponibilidade de matéria-prima, trata-se de uma técnica mais simples e barata, quando comparada com outros métodos biológicos, como a utilização de plantas inteiras e microrganismos (MITTAL *et al.*, 2013). Este processo quimicamente complexo ocorre pela combinação de biomoléculas presentes no extrato - tais como: enzimas, proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, vitaminas, flavonóides, alcalóides, ácido tânico, polifenóis, terpenóides, etc - que são capazes de agirem como agentes redutores dos íons metálicos e estabilizantes das nanopartículas (Figura 14) (SHARMA *et al.*, 2009; AKHATAR, 2013). Além disso, fatores como: natureza do extrato, concentração do sal metálico, pH, temperatura e tempo de contato

podem alterar a taxa de produção das nanopartículas, bem como a sua quantidade, entre outras características (DWIVEDI; GOPAL, 2010).

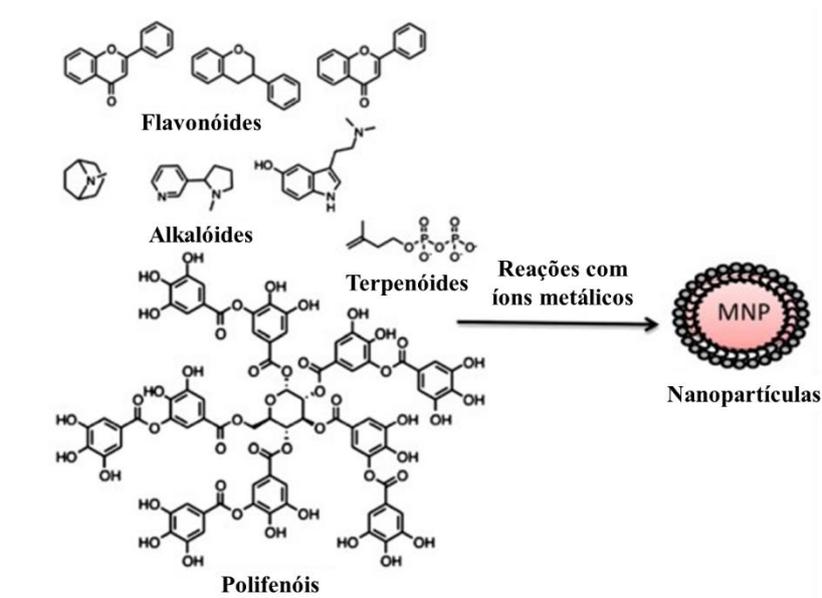


Figura 14: Principais constituintes do extrato de plantas responsáveis pela bioredução, crescimento e estabilização das nanopartículas (Adaptada de MITTAL *et al.*, 2013).

Alguns dos extratos vegetais mais utilizados para a biossíntese das Np-Ag são obtidos a partir de folhas de gerânio, alfafa, aloe vera (babosa), cânfora, capim-limão, etc (RAI, 2013). Utilizando-se extrato de folhas de gerânio (*Pelargonium graveolens*) e solução de  $\text{AgNO}_3$ , Shankar e colaboradores (2003) produziram Np-Ag altamente estáveis e predominantemente esféricas, com 16-40 nm de diâmetro. Devido a estes resultados, foi observado que a taxa de redução dos íons  $\text{Ag}^+$  a partir de extrato de folhas de gerânio é mais rápida do que aquela observada em estudo anterior, fazendo uso do fungo *Fusarium oxysporum*. Logo, os autores concluem que o uso de plantas na biossíntese de nanopartículas metálicas apresenta vantagens em relação à utilização de microrganismos.

Em trabalho reportado por Franco-Romano *et al.* (2014), nanopartículas de ouro foram rapidamente sintetizadas a partir de extrato de folhas de gerânio (*Pelargonium zonale*) em um processo utilizando ultrassom de alta potência. Por esta razão, após um tempo de síntese recorde de 3,5 minutos, foi possível obter nanopartículas com diâmetro na faixa de 8-20 nm, que se mantiveram estáveis por 8 semanas a  $4^\circ\text{C}$ , na ausência de luz. Estudando-se especificamente o extrato de gerânio, análises por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) indicaram a presença de moléculas polihidroxiladas, como os terpenoides, capazes de

reduzirem grupos aldeídos e grupos carboxílicos e atuarem como estabilizantes das nanopartículas. Somado a isso, os autores sugerem que o uso de extrato de gerânio como meio para biossíntese de nanopartículas de ouro apresenta algumas vantagens, como: atividade antioxidante, propriedades antimicrobianas e inibidoras do crescimento bacteriano, além de ser uma planta amplamente disponível em diversas regiões do planeta.

Outra característica interessante e que reforça a utilização de gerânio no desenvolvimento de biomateriais para o tratamento de feridas está relacionada à sua capacidade para estancar o sangramento. Tal prática, já tradicionalmente usada por povos oriundos da Cordilheira dos Andes, foi testada e comprovada por Páez e Hernández (2003). Logo, em modelo experimental com ratos, os autores observaram que o tempo de sangramento foi 50% menor ao utilizar-se extrato de folhas de *Pelargonium zonale* e 80% menor em procedimento similar, fazendo uso de folhas trituradas da mesma planta. Além disso, o potencial hemostático das folhas de gerânio foi considerado superior àquele observado para folhas de goiaba e similar ao obtido por esponja de gelatina, de efeito já comprovado.

Durante a caracterização das Np-Ag algumas técnicas são frequentemente utilizadas, como: microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia por energia dispersiva (EDS) e difração de raios-X (DRX). Tais análises revelam importantes informações sobre a morfologia, tamanho, composição química, estrutura cristalina (etc) das Np-Ag.

Por fim, outra possível avaliação das Np-Ag é feita através do reconhecimento da banda de ressonância de plasmon de superfície (RPS), em espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-Vísivel). Isto é possível pois, as Np-Ag apresentam propriedades químicas, físicas e óticas bastante diferenciadas daquelas observadas em escalas macro e microscópica (RAI *et al.*, 2009). Logo, as bandas de ressonância plasmônica – comumente encontradas em nanopartículas de metais como, ouro, cobre e prata – são decorrentes da alta razão superfície/volume das nanopartículas e ocorrem devido à oscilação coletiva dos elétrons de condução em resposta à excitação ótica promovida pela aplicação de um campo eletromagnético (FURLANETTO, 2014). Para a prata, ainda que a identificação da região de plasmon esteja na faixa de 400 nm, fatores como: forma, tamanho, distribuição e o meio onde as nanopartículas estão dispersas podem afetar o comprimento de onda e a intensidade das bandas (FURLANETTO, 2014).

### 2.5.3 Np-Ag em celulose

Devido ao seu caráter antimicrobiano, a introdução das Np-Ag na estrutura da celulose representa uma importante modificação, para futuras aplicações na área biomédica e farmacêutica. Nesse sentido, Np-Ag foram incorporadas em esponjas a base de celulose e sua atividade contra *Staphylococcus epidermidis* foi estudada, apresentando excelentes resultados (GUSTAITE *et al.*, 2015). Logo, em apenas um dia de exposição das esponjas às Np-Ag, os autores observaram redução de 99,8% de *S. epidermidis*, enquanto que aumentando o tempo, os resultados chegaram a quase 100% de redução da bactéria. Além disso, através do estudo da cinética de liberação das Np-Ag, foi constatado um efeito prolongado e acumulativo, em que o equilíbrio ocorreu em torno de 24h, liberando cerca de 29, 35 e 51 µg de prata após um, dois e quatro dias de absorção, respectivamente.

Sivaranjana *et al.* (2017) avaliaram a produção de Np-Ag *in situ* em matriz de celulose, utilizando extrato de folhas de *Cassia Alata* como agente redutor. Para a síntese e impregnação das Np-Ag na matriz, a celulose foi primeiramente mergulhada em 10% do extrato por 24h e depois em soluções de 1-5 mM de AgNO<sub>3</sub> por 12h. Os resultados encontrados confirmaram a presença das nanopartículas dentro e fora dos filmes de celulose, com diâmetros de aproximadamente 50-59 nm e 69 nm, respectivamente. Por esta razão, os filmes exibiram boa atividade contra *Escherichia coli*. Comparando-se à celulose pura, os filmes apresentaram maior resistência à tração e menor estabilidade térmica a 300°C, exibindo apenas interações físicas (ou forças eletrostáticas) com a matriz. Logo, os autores concluem que devido aos bons resultados com os testes mecânicos e atividade antimicrobiana, os nanocompósitos de celulose/Np-Ag podem ser considerados boas opções para o uso na área médica e de embalagens.

Em experimento recente conduzido por Singla *et al.* (2017), um biocompósito a base de celulose nanocristalina de folhas de bambu foi funcionalizado com Np-Ag, utilizando extrato de *Syzygium cumini* como agente bio redutor, para o tratamento de feridas *in vivo*. Inicialmente, testes de citotoxicidade do biocompósito *in vitro* revelaram ausência de toxicidade às células denominadas queratinócitos (presentes no tecido epitelial), indicando que o material é seguro para o tratamento de feridas na pele. Aplicando o biocompósito na forma de pomada e filme (contendo 0,05% de Ag) em ratos, observou-se diminuição na produção de agentes anti-inflamatórios, favorecendo a reparação do tecido, com bons resultados em menos de 14 dias. Para os autores, além da ação bactericida e biocompatibilidade, a eficiência do biocompósito

também está associada à sua alta capacidade de retenção de água, capaz de absorver umidade em excesso ao redor da ferida, favorecendo no processo de cura.

Outros trabalhos reportam que o uso de biocompósitos a base de celulose e Np-Ag são seguros para o tratamento de feridas, pois além de seu efeito antimicrobiano, não apresentam toxicidade às células (ANGELOVA *et al.*, 2016; SHAHEEN *et al.*, 2017). Em estudo feito por Morini *et al.* (2018), nanocompósitos a base de celulose bacteriana e Np-Ag (obtidas por síntese verde utilizando extrato de frutas de *C. colocynths*), foram avaliados quanto à sua atividade antimicrobiana, citotoxicidade e propriedades curativas. Os resultados mostraram que o material revelou melhores atividades antimicrobianas para as bactérias *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, na concentração de 8% de Ag, com zonas de inibição de 15,3; 16,2; 14,5 mm, respectivamente. Esta mesma amostra também demonstrou menor toxicidade às células do tecido conjuntivo (fibroblastos) após 72 horas de incubação. Para os ensaios de cicatrização *in vitro*, verificou-se que a presença de Np-Ag na matriz de celulose permitiu a migração das células durante o processo curativo e que a amostra contendo 8% de Ag favoreceu o fechamento completo da ferida após 48 horas. Logo, os autores concluíram que a utilização de nanocompósitos a base de celulose e Np-Ag, obtidas a partir de síntese verde, resultam em materiais com boas propriedades antimicrobianas e curativas, com grande potencial para atuarem no tratamento de feridas.

### 3. JUSTIFICATIVA

A Tese visa contribuir para o desenvolvimento de um biomaterial nacional, de origem renovável, capaz de favorecer no processo de cicatrização de feridas. Além disso, há poucos relatos de pesquisas na literatura referentes à síntese de membranas celulósicas, oriundas da biomassa, para aplicação no tratamento de feridas.

### 4. OBJETIVOS

Obter filmes de celulose, a partir da extração da fibra celulósica da casca da batata e preparar membranas antimicrobianas, por meio da biossíntese das Np-Ag, para aplicação no tratamento de feridas.

#### 4.1 Objetivos específicos

- Extrair e purificar a fibra de celulose presente na casca da batata.
- Avaliar o efeito da concentração de reagentes e temperatura no processo de obtenção da membrana de celulose a partir da casca da batata, utilizando o planejamento fatorial  $2^2$ .
- Caracterizar a membrana de celulose por métodos físicos e químicos de análise.
- Preparar e caracterizar o extrato das folhas de gerânio (*Pelargonium zonale*).
- Sintetizar o biocompósito fibra celulósica/nanopartícula de prata (FC/Np-Ag).
- Caracterizar o biocompósito FC/Np-Ag utilizando métodos físicos e químicos
- Estudar a cinética e termodinâmica da liberação das Np-Ag.
- Avaliar a atividade antimicrobiana do biocompósito FC/Np-Ag

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Materiais

Para a síntese das membranas a base de celulose foram utilizadas cascas de batata inglesa (*Solanum tuberosum*), fornecidas pelo Restaurante Churras Vadinho, localizado em Itajubá/MG. As cascas foram lavadas para retirada de terra, entre outras impurezas, e armazenadas em geladeira até o uso.

Para o processo de extração da fibra de celulose foram utilizados os seguintes reagentes: hidróxido de sódio (NaOH) PA 97% e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 35% V/V. Ambos os reagentes procedem da Sigma-Aldrich e foram usados como recebidos.

### 5.2 Metodologia

#### 5.2.1 Desenvolvimento da membrana a base de celulose

O processo para extração e purificação da celulose proveniente das cascas da batata foi feito em duas etapas: polpação alcalina com NaOH e branqueamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Vinte e cinco gramas de cascas de batata em massa seca foram adicionadas à 500 mL de água deionizada (1:20  $m_{\text{fibra}}/V_{\text{solução}}$ ) para moagem em liquidificador por cinco minutos. As cascas de batata moídas foram filtradas com peneira, cujos poros possuem 1 mm de diâmetro. A este material adicionou-se solução de 0,5 mol/L de NaOH, a 80°C, por 2,5h, sob agitação mecânica (CHEN, 2011). O tratamento alcalino foi feito duas vezes de modo a garantir completa remoção da hemicelulose, lignina e impurezas. As polpas obtidas foram lavadas com água deionizada até pH próximo de 7 e filtradas a gravidade.

A etapa de branqueamento da polpa pré-tratada com NaOH foi feita utilizando-se solução de 15% m/m de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a 60°C, por 6h, sob agitação magnética. Para garantir a obtenção da membrana, este procedimento foi feito duas vezes. O material resultante de cada etapa de branqueamento foi lavado com água deionizada até pH próximo de 7 e filtrado a gravidade.

O cálculo do rendimento de massa após todo o processo foi determinado, de acordo com a equação 1. A determinação da massa seca foi feita em balança determinadora de umidade I-Thermo 163L.

$$R (\%) = \left[ \frac{Mf}{Mi} \right] \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde,

$R$  = Rendimento em porcentagem

$Mf$  = Massa seca obtida ao final do processo.

$Mi$  = Massa seca do material in natura (cascas de batata).

Para evitar a contaminação por fungos, a membrana obtida após a segunda etapa de branqueamento foi mantida em estufa a vácuo, na temperatura de 20°C até as demais etapas de caracterização.

### 5.2.2 Efeito da concentração de reagentes e temperatura

Para estudar o efeito da concentração de reagentes e da temperatura na polpação alcalina, foi aplicado o planejamento fatorial  $2^2$ , cujos níveis estão representados na Tabela 1 e as condições dos experimentos na Tabela 2. A fim de minimizar a influência de efeitos externos que fogem do controle do experimentador, os ensaios foram feitos de forma aleatória.

Tabela 1: Codificação dos níveis para as variáveis NaOH (mol/L) e Temperatura (°C) utilizado no planejamento estatístico  $2^2$ .

Variáveis	Níveis	
	-1	1
X1 = NaOH (mol/L)	0,5	1,0
X2 = Temperatura (°C)	60	80

Tabela 2: Condições do planejamento fatorial  $2^2$  com trélicas.

Ensaio	Níveis Codificados		Níveis Reais	
	NaOH (X1)	Temperatura (X2)	NaOH (X1)	Temperatura (X2)
1	-1	-1	0,5	60
2	-1	-1	0,5	60
3	-1	-1	0,5	60
4	1	-1	1,0	60
5	1	-1	1,0	60
6	1	-1	1,0	60
7	-1	1	0,5	80
8	-1	1	0,5	80
9	-1	1	0,5	80
10	1	1	1,0	80
11	1	1	1,0	80
12	1	1	1,0	80

Ao final do processo de extração e purificação da celulose, as variáveis escolhidas como respostas foram: rendimento em massa (variável quantitativa) e propriedade formadora de filme (variável qualitativa).

A análise estatística foi feita através dos programas *Design Expert* e *Statistica 7*, considerando os níveis de significância de 95% de confiança. Os resultados foram apresentados através de tabelas de estimativas de efeitos, tabelas de análise de variância (ANOVA) e gráficos de superfície.

### 5.2.3 Síntese do biocompósito fibra celulósica/nanopartícula de prata (FC/Np-Ag)

A preparação do biocompósito fibra celulósica/nanopartícula de prata (FC/Np-Ag) foi feita em três etapas: obtenção do extrato das folhas da planta *Pelargonium zonale* (nome popular: gerânio), intumescimento das membranas no extrato e síntese/inserção da prata (Ag) nas membranas, conforme procedimento descrito por Sivaranjana *et al.* (2017).

Inicialmente, cerca de 10g de folhas saudáveis de *Pelargonium zonale* foram cuidadosamente lavadas e cortadas em tamanhos menores. Em seguida, este material foi transferido para bquer de vidro com 100 mL de água destilada para a obtenção do extrato, em banho de 80°C por 15 min. Passado o tempo anteriormente mencionado, o extrato foi filtrado com bomba a vácuo e funil buchner de vidro com disco poroso n° 2 e armazenado em

congelador até o uso. Para a caracterização do extrato, três alíquotas de 1,5 mL foram separadas para liofilização.

Com a finalidade de utilizar o extrato de folhas de gerânio na biossíntese das nanopartículas de prata, membranas a base de celulose (cerca de 1 cm<sup>2</sup>, cada) ficaram imersas em 10 mL de extrato por 24h, em geladeira. Após esta etapa, as membranas intumescidas foram transferidas para recipientes de vidro âmbar, longe da luz, onde acrescentou-se a cada um deles, separadamente, 10 mL de solução 0,001 (B); 0,002 (C); 0,003 (D); 0,004 (E) e 0,005 (F) mol/L de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>). Uma amostra denominada “branco” (A) foi feita substituindo o extrato de gerânio da etapa inicial por água destilada, seguido de intumescimento em 0,003 mol/L de AgNO<sub>3</sub>. Ao final de 48 horas, as membranas e o branco foram cuidadosamente lavados com água destilada e secos em temperatura ambiente, obtendo-se assim o biocompósito FC/Np-Ag.

## **5.3 Técnicas de Caracterização**

### **5.3.1 Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

A estrutura molecular dos materiais foi investigada a partir de análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR).

As análises de FTIR foram feitas em Espectrômetro Shimadzu, modelo IR Tracer 100, na região de 600–4000 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. Para as medidas, utilizou-se um acessório de refletância total atenuada (ATR), constituído por um cristal misto de Diamante/ZnSe. Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente com amostras em forma de filme e apresentados a partir de gráficos que correlacionam % transmitância (eixo das ordenadas) por número de onda (cm<sup>-1</sup>) (eixo das abscissas).

### **5.3.2 Análise Termogravimétrica (TGA)**

O comportamento térmico das amostras - bem como suas principais temperaturas de degradação térmica e perdas de massa - foi investigado através de análises termogravimétricas no equipamento TGA-50 Shimadzu. Os ensaios foram feitos com massas de, aproximadamente,

15 mg por amostra, a taxas de aquecimento constantes (5,10,15°C/min), na faixa de temperatura de 25-950°C, em atmosfera de ar.

### 5.3.2.1 Cálculo da Energia de Ativação da degradação térmica

A energia de ativação do processo de degradação da celulose presente na membrana foi determinada de acordo com o método de Kissinger (1957), através do primeiro pico de máxima degradação térmica da celulose em 329, 340 e 350°C, nas taxas de aquecimento de 5, 10, e 15°C/min, respectivamente. Os cálculos realizados seguiram procedimento padrão conforme descrito na norma ASTM E1641-04.

Basicamente, a técnica de Kissinger consiste na integração por partes, gerando uma equação que relaciona diferentes taxas de aquecimento com as temperaturas da máxima taxa de perda de massa. Nesse sentido, a energia de ativação envolvida na perda de massa de um determinado material pode ser obtida a partir da equação de Arrhenius, descrita abaixo:

$$k(T) = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde  $k(T)$  é a taxa de aquecimento em °C/min,  $A$  é um fator de frequência em  $\text{min}^{-1}$ , que mede a probabilidade das colisões efetivas,  $E_a$  é a energia de ativação da degradação térmica da celulose, expressa em kJ/mol,  $R$  é a constante universal dos gases (8,314 J/Kmol) e  $T$  é a temperatura em K.

Portanto, aplicando-se o logaritmo neperiano em ambos os lados da equação 2, temos:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T} \quad \text{Eq. 3}$$

Plotando-se um gráfico que relaciona o logaritmo neperiano da taxa de aquecimento (eixo das ordenadas) versus o inverso da temperatura absoluta nos picos de maior degradação térmica da celulose (eixo das abscissas), obtém-se o coeficiente angular da reta, que é proporcional ao valor da  $E_a$  investigada.

### 5.3.3 Determinação do intumescimento da membrana

A capacidade de hidratação (intumescimento) da membrana foi determinada conforme Cavalcanti *et al.*, (2002). Inicialmente, a massa seca foi obtida após secagem em estufa a 50°C, por 16 h. Em seguida, corpos de prova de 1 cm<sup>2</sup> foram imersos em solução de soro fisiológico (solução NaCl 0,9% m/m) e retirados com pinça para pesagens em balança analítica a cada 1 minuto, nos primeiros 10 minutos, e depois nos tempos de 30 e 60 minutos. Antes de cada pesagem, o excesso de solução foi eliminado utilizando um papel filtro. Tais experimentos foram conduzidos nas temperaturas de 10, 25 e 40°C, em triplicatas. O grau de intumescimento (I) – ou *degree of swelling* - foi obtido a partir da equação 4, onde M<sub>t</sub> corresponde a massa da membrana intumescida em determinado tempo e M<sub>0</sub> é a massa inicial da membrana:

$$I (\%) = \left[ \frac{M_t - M_0}{M_0} \right] \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

A análise estatística das médias das massas foi feita através da ferramenta ANOVA *One-Way* (Análise de Variância de fator único), com nível de significância de 95% de confiança.

#### 5.3.3.1 Estudo do processo de difusão da membrana

A fim de se determinar a natureza do processo de difusão do soro fisiológico na membrana, nas três temperaturas estudadas (10, 25 e 40°C), utilizou-se a equação de Ritger Peppas (1987) e seu logaritmo natural (equações 5 e 6, respectivamente), que descreve o processo de difusão em polímeros:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{Eq. 5}$$

$$\ln \left( \frac{M_t}{M_\infty} \right) = \ln k + n \ln t \quad \text{Eq. 6}$$

Onde M<sub>t</sub> e M<sub>∞</sub> representam a massa da membrana intumescida no tempo t e no equilíbrio, k é uma constante característica do sistema, relativa à estrutura da rede polimérica e n é o expoente difusional, que determina o tipo de difusão do solvente. Desta forma, a partir da regressão linear que relaciona  $\ln \left( \frac{M_t}{M_\infty} \right)$  versus  $\ln t$  - nos estágios iniciais do intumescimento - é possível determinar o coeficiente angular da reta n, que pode ser classificado como:

- ✓ Mecanismo de difusão Fickiana ou do tipo I, em que a taxa de difusão do solvente é inferior à taxa de relaxação das cadeias do polímero, para  $n = 0,5$ ;
- ✓ Mecanismo de difusão não-Fickiana ou do tipo anômala, em que a taxa de difusão do solvente aproxima-se da taxa de relaxação das cadeias do polímero, para  $0,5 < n < 1$ ;
- ✓ Mecanismo de difusão do tipo II, em que a taxa de difusão do solvente é igual a taxa de relaxação das cadeias do polímero, com  $n \geq 1$  (RIBEIRO, 2016).

Para o cálculo da energia de ativação do processo de intumescimento ( $E_D$ ), seguiu-se procedimento descrito por Abraham *et al.* (2001). Primeiramente, o coeficiente de difusão ( $D$ ) foi determinado através da regressão linear da equação 7, para as temperaturas de 10, 25 e 40°C, em que  $h$  representa a espessura inicial da membrana ( $h = 6\mu\text{m}$ ), medida com micrômetro Mitutoyo.

$$\ln\left(1 - \frac{Mt}{M_\infty}\right) = \ln\left(\frac{8}{\pi^2}\right) - \frac{D\pi^2 t}{h^2} \quad \text{Eq. 7}$$

Logo, plotando  $\ln\left(1 - \frac{Mt}{M_\infty}\right)$  versus  $t$ , obtém-se o coeficiente angular da reta que é proporcional à  $D$ . Através de uma correlação com a equação de Arrhenius e tomando como base seu logaritmo natural, tem-se que:

$$D = D_0 e^{-\frac{E_D}{RT}} \quad \text{Eq. 8}$$

$$\ln D = \ln D_0 - \frac{E_D}{R} \times \frac{1}{T} \quad \text{Eq. 9}$$

Onde  $D_0$  é o fator pré-exponencial ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ),  $R$  a constante universal dos gases (8,314 J/Kmol) e  $T$  a temperatura absoluta (K).

Para a obtenção da energia de ativação do processo de intumescimento ( $E_D$ ), utilizou-se a equação 9 para duas temperaturas  $T_1$  e  $T_2$ , sendo  $T_2 > T_1$ . Logo, através de um rearranjo algébrico, que subtrai a equação com a temperatura mais alta ( $T_2$ ) pela equação com a temperatura mais baixa ( $T_1$ ), chegou-se à equação 10. Desta forma, determinou-se o valor de  $E_D$ , que corresponde a energia de ativação necessária para promover a abertura das cadeias poliméricas e permitir a difusão do solvente, expressa em kJ/mol.

$$\ln \frac{D_2}{D_1} = \frac{E_D}{R} \left( \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad \text{Eq. 10}$$

Em que  $D_2$  e  $D_1$  são os coeficientes de difusão nas temperaturas  $T_2$  e  $T_1$ , respectivamente.

### 5.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para o estudo da morfologia dos materiais, utilizou-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), no equipamento Superscan SSX-550 (Shimadzu Corporation), com um feixe de elétrons de 15 kV e acoplado a um analisador de espectroscopia de energia dispersiva (EDS). Antes das análises, as amostras foram secas a vácuo e metalizadas com ouro em equipamento IC-50 ion coater (Shimadzu).

### 5.3.5 Difração de raios-X (DRX)

Os espectros de raios-X da celulose extraída da casca de batata e do biocompósito FC/Np-Ag foram obtidos usando um difratômetro Rigaku Japan, usando radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ) e monocromador de grafite. Os difratogramas foram coletados na faixa de  $5,00$  a  $50,00^\circ$  ângulo ( $2\theta$ ), com passo de  $0,02^\circ$  e velocidade de varredura de  $5,0$  s/passos. A distância interplanar ( $d$ ) foi calculada utilizando a equação de Bragg abaixo (equação 11) (BRAGG, 1913).

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad \text{Eq. 11}$$

Onde  $n$  é um número natural,  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação incidente,  $d$  é a distância entre planos atômicos e  $\theta$  é o ângulo de incidência em relação ao plano considerado.

O grau de cristalinidade relativo (C%) foi calculado empiricamente usando o método de Segal, de acordo com a equação 12 mostrada a seguir (NAM *et al.*, 2016).

$$C(\%) = \left( \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) * 100 \quad \text{Eq. 12}$$

Onde  $I_{002}$  representa a intensidade do pico em 002 ( $2\theta = 22^\circ$ ), cuja intensidade está relacionada com a região cristalina da celulose; e  $I_{am}$  representa a região amorfa da celulose, correspondendo à intensidade do padrão de difração em  $2\theta = 18^\circ$ .

O tamanho das Np-Ag sintetizadas na matriz de celulose pelo extrato de gerânio foi calculado utilizando a equação 13, conhecida como equação de Scherrer (POLETTO *et al.*, 2014).

$$D = \frac{K*\lambda}{\beta*cos\theta} \quad \text{Eq. 13}$$

Onde  $D$  é o diâmetro médio das Np-Ag,  $K$  é uma constante de valor 0,94;  $\lambda$  é o comprimento de onda da fonte de raios-X utilizando  $CuK\alpha$  (0,15406 nm);  $\beta$  corresponde à largura na meia altura do pico de difração relativo ao plano (1 0 1) e  $\cos\theta$  se refere a cosseno do ângulo  $\theta$  de Bragg no plano (1 0 1).

### 5.3.6 Espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-vis)

Análises de espectroscopia na região do UV-Vis foram feitas para verificar a biossíntese das Np-Ag em meio aquoso, liberação das Np-Ag presentes no biocompósito FC/Np-Ag e cinética da liberação. Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro UV-Vis Varian, modelo Cary 50 Bio, na faixa de 220 a 800 nm, em cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico e água destilada como branco.

#### 5.3.6.1 Biossíntese das Np-Ag em meio aquoso

O estudo da biossíntese das Np-Ag foi realizado para identificar os picos de ressonância de plasmon de superfície (RPS), que confirmam a existência de nanopartículas no meio reacional. Para isso, utilizou-se solução contendo 10 mL de extrato de gerânio e 10 mL de  $AgNO_3$  3mM (1:1), na temperatura de  $23^\circ C$ . Em intervalos pré-determinados de tempo, alíquotas de 1 mL foram retiradas da solução e misturadas com 2 mL de água destilada na cubeta, para posteriores análises no UV-Vis.

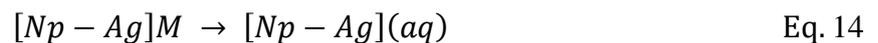
### 5.3.6.2 Estudo da liberação das Np-Ag

No estudo da liberação *in vitro*, as amostras de biocompósito FC/Np-Ag (amostra D, item 5.2.3) foram imersas em 20 mL de água destilada e mantidas nas temperaturas de 23, 30 e 37°C. Em intervalos pré-determinados de tempo, alíquotas de 1 mL foram retiradas do complexo e misturadas com 2 mL de água destilada na cubeta, a fim de que a liberação das Np-Ag fosse acompanhada por meio do espectro UV-vis. A cada alíquota retirada, fez-se a reposição com o mesmo volume de água destilada. As concentrações das Np-Ag liberadas do biocompósito FC/Np-Ag em função do tempo foram determinadas utilizando uma curva de calibração, descrita a seguir.

Para a construção da curva de calibração, utilizou-se como solução padrão uma mistura contendo 20 mL de extrato de gerânio e 20 mL de AgNO<sub>3</sub> 3mM (1:1). Esta solução agiu por 72 horas. Após este tempo, determinou-se a concentração (mg/mL) da solução aquosa contendo o complexo formado pelas Np-Ag e o extrato de gerânio. A partir desta solução padrão foram feitas diluições volumétricas. Logo, a partir da solução padrão e suas respectivas diluições, foram realizadas medidas de absorvância no comprimento de onda em 370 nm. Desta forma, foi possível construir um gráfico que correlaciona a absorvância em função da concentração de Np-Ag liberadas. A equação da reta foi obtida por regressão linear.

### 5.3.6.3 Cinética da liberação das Np-Ag

Conhecendo-se o valor inicial e no tempo  $t$  da concentração das Np-Ag na membrana (amostra D, item 5.2.3) foi possível realizar o estudo cinético da liberação das nanopartículas em solução aquosa, no intervalo entre 5 e 60 minutos. Para isso, seguiu-se o modelo cinético de ordem zero e as equações utilizadas são mostradas a seguir:



$$-\frac{d[Np - Ag]M}{dt} = k \quad \text{Eq. 15}$$

Onde:

$[Np - Ag]M$  = Concentração de Np-Ag na membrana

$[Np - Ag](aq)$  = Concentração de Np-Ag em solução aquosa

Integrando a equação 15, temos:

$$-\int_{[Np-Ag]M0}^{[Np-Ag]Mt} d[Np - Ag]M = k \int dt$$

$$-([Np - Ag]Mt - [Np - Ag]M0) = kt \quad \text{Eq.16}$$

Através do rearranjo dos fatores da equação 16, obtemos a equação 17 abaixo:

$$[Np - Ag]Mt = [Np - Ag]M0 - kt \quad \text{Eq. 17}$$

Onde:

$[Np - Ag]M0$  = Concentração inicial de Np-Ag na membrana

$[Np - Ag]Mt$  = Concentração de Np-Ag na membrana no tempo  $t$

Desta forma, plotando os dados obtidos de  $[Np-Ag]_{Mt}$  na equação 17, gera-se uma reta, que por regressão linear, permite determinar seu coeficiente angular e, portanto, os valores de  $k$  (constante de velocidade), nas temperaturas de 23, 30 e 37°C.

#### 5.3.6.4 Parâmetros termodinâmicos da liberação das Np-Ag

Para o cálculo da energia de ativação da cinética de liberação das Np-Ag no meio reacional ( $E_L$ ), expressa em kJ/mol, tomou-se como base a equação de Arrhenius e seu logaritmo natural, de acordo com as equações 18 e 19:

$$k = A_0 e^{-\frac{E_L}{RT}} \quad \text{Eq. 18}$$

$$\ln k = \ln A_0 - \frac{E_L}{R} \times \frac{1}{T} \quad \text{Eq. 19}$$

Onde  $A_0$  é o fator pré-exponencial (mg/mL\*min),  $R$  é a constante universal dos gases (8,314 J/Kmol) e  $T$  é a temperatura absoluta (K).

Utilizando-se a equação 19 para duas temperaturas  $T_1$  e  $T_2$  (sendo  $T_2 > T_1$ ) e através de um rearranjo algébrico, que subtrai a equação com a temperatura mais alta ( $T_2$ ) pela equação com a temperatura mais baixa ( $T_1$ ), chegou-se à equação 20. Logo, foi possível determinar o valor de  $E_L$  (kJ/mol), que corresponde a energia de ativação necessária para promover a abertura das cadeias poliméricas da membrana de celulose, de modo a permitir a liberação das Np-Ag.

$$\ln \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_L}{R} \left( \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad \text{Eq. 20}$$

Onde  $k_2$  e  $k_1$  são as constantes de velocidade cinética da liberação nas temperaturas  $T_2$  e  $T_1$ , respectivamente.

Para calcular os outros parâmetros termodinâmicos da liberação das Np-Ag, como entalpia ( $\Delta H$ ), entropia ( $\Delta S$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), partiu-se inicialmente da equação de Eyring, que se trata da equação fundamental da teoria do estado de transição (LAIDLER *et al.*, 1983).

$$k = \frac{k_B T}{h} K_c^\ddagger \quad \text{Eq. 21}$$

Onde  $k$  é a constante de velocidade cinética do processo de liberação,  $k_B$  é a constante de Boltzman,  $T$  é a temperatura em Kelvin,  $h$  é a constante de Planck e  $K_c^\ddagger$  é a constante de equilíbrio entre o complexo ativado e os reagentes. Vale ressaltar que, o complexo ativado é o estado intermediário (ou seja, estado de transição) formado entre reagentes e produtos, em cuja estrutura existem ligações enfraquecidas presentes nos reagentes e formação de novas ligações nos produtos.

De acordo com a termodinâmica,  $\Delta G$  da reação está relacionada à constante termodinâmica de equilíbrio ( $K_{eq}$ ) pela expressão:

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq} \quad \text{Eq. 22}$$

Onde  $R$  é a constante dos gases (8,314 J/Kmol) e  $T$  a temperatura em Kelvin (K).

Se esta expressão for aplicada à etapa de formação do complexo ativado, tem-se que:

$$(\Delta G^\ddagger) = -RT \ln K_C^\ddagger \quad \text{Eq. 23}$$

Desta forma, a partir da equação 21 obtém-se  $K_C^\ddagger$  que, substituindo seus valores na equação 23 permite determinar a energia livre de Gibbs do complexo ativado ( $\Delta G^\ddagger$ ), durante o processo de liberação das Np-Ag.

Dando continuidade aos cálculos, toma-se como base a equação 23 sob a forma exponencial:

$$K_C^\ddagger = e^{-\frac{(\Delta G^\ddagger)}{RT}} \quad \text{Eq. 24}$$

Substituindo  $K_C^\ddagger$  na equação de Eyring, temos:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{(\Delta G^\ddagger)}{RT}} \quad \text{Eq. 25}$$

Sabe-se da termodinâmica que  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  e aplicando esta relação à etapa de formação do complexo ativado, obtém-se:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad \text{Eq. 26}$$

Utilizando este conceito podemos reescrever a equação 25 da seguinte forma:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{(\Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger)}{RT}} \quad \text{Eq. 27}$$

Aplicando a equação 27 para  $k_1$  e  $k_2$  (constantes de velocidade cinética do processo de liberação) e dividindo uma expressão pela outra, obtém-se a equação 28, no intervalo de temperatura  $T_1$  e  $T_2$ , respectivamente, em que  $T_1 < T_2$ .

$$\frac{k_2}{k_1} = \frac{T_2}{T_1} e^{\frac{\Delta H^\#}{R} \left[ \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right]}$$

Eq. 28

Desta forma, uma vez que  $R$  é a constante dos gases (8,314 J/Kmol), calcula-se  $\Delta H^\#$  que é a entalpia do complexo ativado no processo de liberação das Np-Ag, no intervalo de temperatura.

Finalmente, conhecendo-se os valores para  $\Delta G^\#$  e  $\Delta H^\#$ , por analogia da equação 26 encontra-se  $\Delta S^\#$ , que se trata da entropia do sistema estudado durante o estado de transição na temperatura  $T$  (K).

### 5.3.7 Teste de sensibilidade bacteriana às Np-Ag

A fim de se avaliar a atividade antimicrobiana das amostras de biocompósito FC/Np-Ag, seguiu-se a metodologia dos testes de disco-difusão em meio Muller Hilton ágar. As linhagens bacterianas utilizadas foram derivadas de cepas padrão ATCC (American Type Culture Collection), sendo estas: Gram-positiva de *Staphylococcus aureus* (derivada ATCC 25923) e Gram-negativa de *Escherichia coli* (derivada ATCC 25922). Entre as bactérias encontradas em feridas, as que se apresentam em maior porcentagem são a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (BESSA *et al.*, 2013) o que justifica o uso de ambas no estudo microbiológico das amostras.

Nesse sentido, discos de 6 mm de diâmetro dos biocompósitos FC/Np-Ag (amostras B, C, D, E e F, item 5.2.3) e da membrana intumescida no extrato foram dispersos sobre placas de ágar após a aplicação do inóculo bacteriano, conforme padrão de diluição 0,5 da escala Mac Farland (ou seja,  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). As placas em triplicatas foram mantidas em estufas de incubação, por 24 horas, a 37°C. Após este período, mediu-se o diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor de cada disco, indicando o perfil de sensibilidade das bactérias às amostras.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Obtenção da membrana de celulose

#### 6.1.2 Estudo fatorial da concentração de reagentes e temperatura

As membranas foram obtidas após extração e purificação da celulose proveniente das cascas da batata. Este processo dividiu-se em duas etapas: tratamento com NaOH e branqueamento com 15% m/m de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para avaliar o efeito da concentração dos reagentes e da temperatura na formação do filme (membrana), foi realizado o planejamento fatorial 2<sup>2</sup> na etapa de polpação alcalina. Os experimentos foram feitos em tréplicas, totalizando 12 ensaios (Tabela 2, item 4.2.2). Os resultados encontrados para as variáveis escolhidas como respostas (rendimento e formação de filme) estão representadas nas Tabelas 3 e 4, enquanto que os materiais obtidos ao final do processo de desenvolvimento da membrana estão ilustrados na Figura 15.

Tabela 3: Rendimentos segundo a concentração de NaOH e a temperatura no planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.

Condição	Fatores		Repetições			Rendimento (%)	
	[NaOH] (mol/L)	Temperatura (°C)	1	2	3	Médias	Desvios
A	0,5	80	1,720	1,590	1,640	1,650	0,047
B	1	80	0,760	0,670	0,810	0,747	0,051
C	0,5	60	3,630	3,680	3,450	3,587	0,091
D	1	60	2,160	1,970	2,060	2,063	0,064

Tabela 4: Formação de filme segundo a concentração de NaOH e a temperatura no planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.

Condição	Fatores		Repetições			Filme
	[NaOH] (mol/L)	Temperatura (°C)	1	2	3	Médias
A	0,5	80	SIM	SIM	SIM	SIM
B	1	80	SIM	SIM	SIM	SIM
C	0,5	60	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
D	1	60	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO

O aumento da concentração de NaOH e da temperatura no tratamento alcalino, seguido de branqueamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi capaz de isolar a celulose e remover os outros principais componentes da casca da batata (hemicelulose, lignina e amido), como pode ser observado pela

diminuição dos rendimentos nos ensaios (Tabela 3) e confirmado pelas análises de caracterização do material, descritas no item 5.2.

O maior rendimento foi de 3,587% ( $\pm 0,091$ ), obtido para a condição C, com os menores níveis de concentração e temperatura (0,5 mol/L de NaOH e 60°C, respectivamente). No entanto, nestas condições não houve formação de filme (Tabela 4). Nesse sentido, avaliando-se apenas as condições A e B, onde foi verificado presença de membrana de celulose ao final do processo, nota-se que o maior rendimento ocorreu para os experimentos com 0,5 mol/L de NaOH a 80°C (Tabela 3).

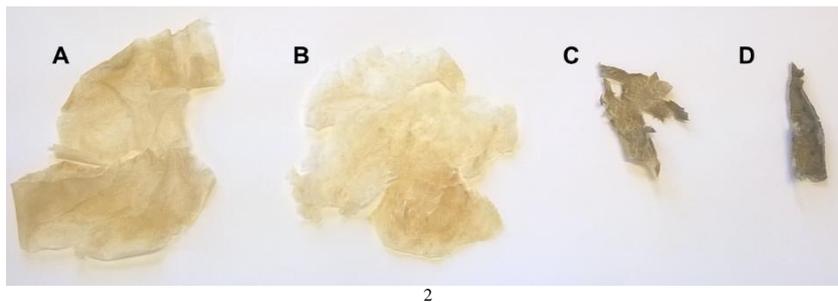


Figura 15: Materiais obtidos após ensaios A, B, C e D no planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.  
Fonte: Arquivo próprio

Através das estimativas dos efeitos para as respostas, é possível notar que o rendimento foi afetado pela concentração de NaOH (mol/L), temperatura (°C) e a interação entre esses dois fatores, como observado através de p-valor  $< 0,05$  (Tabela 5). Desta forma, um incremento na concentração de NaOH e temperatura (nível -1 para +1) resultou em perda de rendimento no processo. No entanto, avaliando os efeitos das variáveis independentes (NaOH e temperatura) sobre a formação de filme, observou-se que apenas o aumento da temperatura foi relevante para a resposta (Tabela 6). Tais resultados também foram observados por meio das outras análises estatísticas, que estão descritas na sequência.

Tabela 5: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste *t* de Student para o rendimento em um nível de 95% de confiança, segundo planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.

Resposta	Fatores	Efeito	Erro Padrão	Coefficiente	Erro Padrão (Coef.)	t(8)	p - valor*
Rendimento (%)	Média	2,012	0,026	2,012	0,026	76,722	< 0,0001
	NaOH (Mol/L)	-1,213	0,052	-0,607	0,026	-23,137	< 0,0001
	Temperatura (°C)	-1,627	0,052	-0,813	0,026	-31,019	< 0,0001
	NaOH x Temperatura	0,310	0,052	0,155	0,026	5,911	0,0004

\*Valores significativos a 95% de confiança estão destacados em vermelho (p-valor < 0,05)

Tabela 6: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste *t* de Student para a formação de filme em um nível de 95% de confiança, segundo planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.

Resposta	Fatores	Efeito*	Erro Padrão	Coefficiente	Erro Padrão (Coef.)	t(8)	p - valor
Filme	Média	0,5	0	0,5	0		
	NaOH (Mol/L)	0	0	0	0		
	Temperatura (°C)	1	0	0,5	0		
	NaOH x Temperatura	0	0	0	0		

\* Conforme nomenclatura utilizada, 1=SIM e 0=NÃO na formação de membrana

A partir da análise de variância (ANOVA) do rendimento (Tabela 7), constatou-se que o modelo foi significativo em um nível de confiança de 95%, assim como para as variáveis independentes e a interação entre elas. Além disso, de acordo com o coeficiente de correlação obtido ( $R^2 = 0,99$ ), o modelo explica 99% dos valores observados, indicando um ótimo ajuste linear para a resposta rendimento. Isso significa que tanto a variação da concentração de NaOH, quanto a variação de temperatura influenciaram significativamente no rendimento do processo.

Para a ANOVA da resposta filme, verificou-se que apenas a variação da temperatura foi significativa em um nível de confiança de 95% (Tabela 8). Desta forma, a obtenção de membrana esteve estatisticamente dependente da variação da temperatura, enquanto que o mesmo não foi observado para o a concentração. Tal observação pode ser confirmada pela Tabela 4, que demonstra a formação de filme nas concentrações de 0,5 e 1 mol/L, somente na temperatura de 80°C. O modelo, por sua vez, foi significativo e apresentou um excelente ajuste linear, com um coeficiente de determinação bastante satisfatório ( $R^2 = 1$ ).

Tabela 7: Análise de variância (ANOVA) sobre o rendimento, de acordo com a variação de NaOH (mol/L) e temperatura (°C) no planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.

Resposta	Fonte da Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (gl)	Quadrado Médio (QM)	Valor F	p-valor*
Rendimento (%)	NaOH	4,417	1	4,417	535,337	< 0.0001
	Temperatura	7,938	1	7,938	962,198	< 0.0001
	NaOH x Temperatura	0,288	1	0,288	34,945	0.0004
	Erro Puro	0,066	8	0,008		
	Total	12,709	11			
<b>R2 = 0,99</b>	<b>Modelo</b>	12,643	3	4,214	510,827	< 0.0001

\*Valores significativos a 95% de confiança estão destacados em vermelho (p-valor < 0,05)

Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) sobre o filme, de acordo com a variação de NaOH (mol/L) e temperatura (°C) no planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.

Resposta	Fonte da Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (gl)	Quadrado Médio (QM)	Valor F	p-valor*
Filme	NaOH	0	1	0	63660000	< 0.0001
	Temperatura	3	1	3		
	NaOH x Temperatura	0	1	0		
	Erro Puro	0	8	0		
	Total	3	11			
<b>R2 = 1</b>	<b>Modelo</b>	3	3	1	63660000	< 0.0001

\*Valores significativos a 95% de confiança estão destacados em vermelho (p-valor < 0,05)

Com base nos dados obtidos da análise de variância, os modelos matemáticos que explicam as variáveis dependentes (rendimento e formação de filme), estão descritos nas equações 29 e 30 em termos dos fatores codificados (-1 e +1), sendo que *A* é a concentração de NaOH (mol/L) e *B* é a temperatura (°C).

$$\text{Rendimento} = 2,01 - 0,61 \times A - 0,81 \times B + 0,16 \times A \times B \quad \text{Eq. 29}$$

$$\text{Formação de Filme} = 0,50 + 0,00 \times A + 0,50 \times B + 0,00 \times A \times B \quad \text{Eq. 30}$$

A partir das equações acima foram geradas curvas de níveis para os modelos do rendimento e da formação de filme (Figura 16).

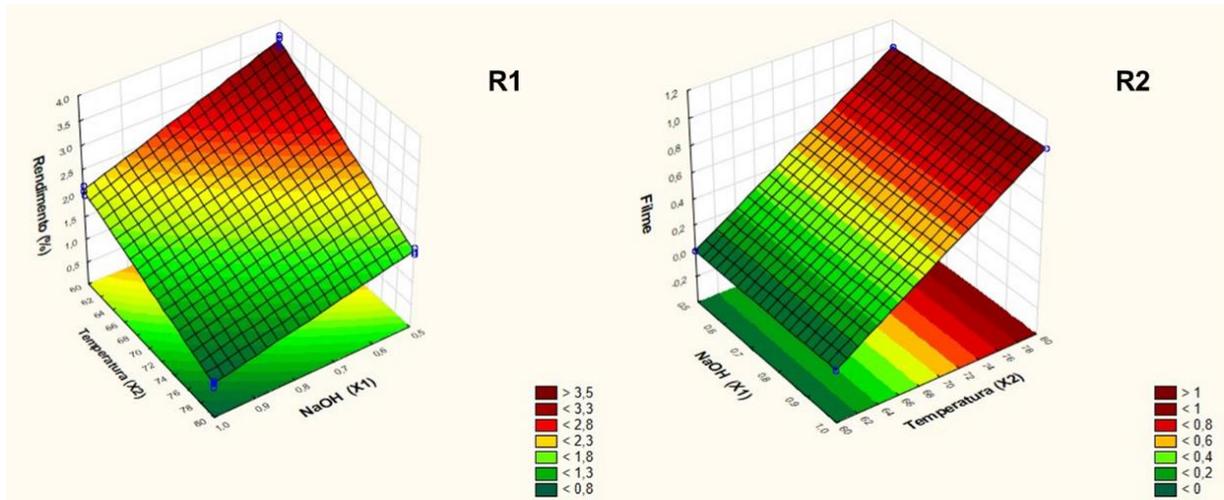


Figura 16: Superfícies de respostas da porcentagem de rendimento (R1) e da formação de filme (R2), para os fatores concentração de NaOH em mol/L (X1) e temperatura em °C (X2), no planejamento fatorial  $2^2$ .

Pela análise do gráfico de rendimento, é possível confirmar visualmente o efeito das variáveis independentes, pois a diminuição do rendimento esteve diretamente proporcional ao aumento do reagente NaOH e da temperatura. Para a superfície de resposta da formação de filme, ficou nítido que o efeito da concentração não teve participação no modelo. Logo, é possível concluir que a obtenção da membrana foi significativamente dependente do aumento da temperatura.

Desta forma, a partir dos resultados obtidos, a melhor condição para a síntese da membrana foi aquela que além de possibilitar a formação de membrana, também resultou em maior rendimento ( $1,650\% \pm 0,047$ ), utilizando 0,5 mol/L de NaOH a  $80^{\circ}\text{C}$ , por 2,5h, seguido da etapa de branqueamento (15% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $60^{\circ}\text{C}$ , por 6h). Portanto, o material obtido a partir da condição A (Tabelas 3 e 4) foi o escolhido para as demais análises (caracterizações, síntese do biocompósito e das nanofibras), dando sequência ao estudo proposto neste trabalho.

## 6.2 Caracterização da membrana a base de celulose

### 6.2.1 Análises da estrutura molecular por FTIR

A fim de identificar a estrutura molecular do material obtido após extração e purificação da celulose da casca da batata, um estudo comparativo foi feito através das análises de espectroscopia FTIR da membrana e do material *in natura* (Figura 17).

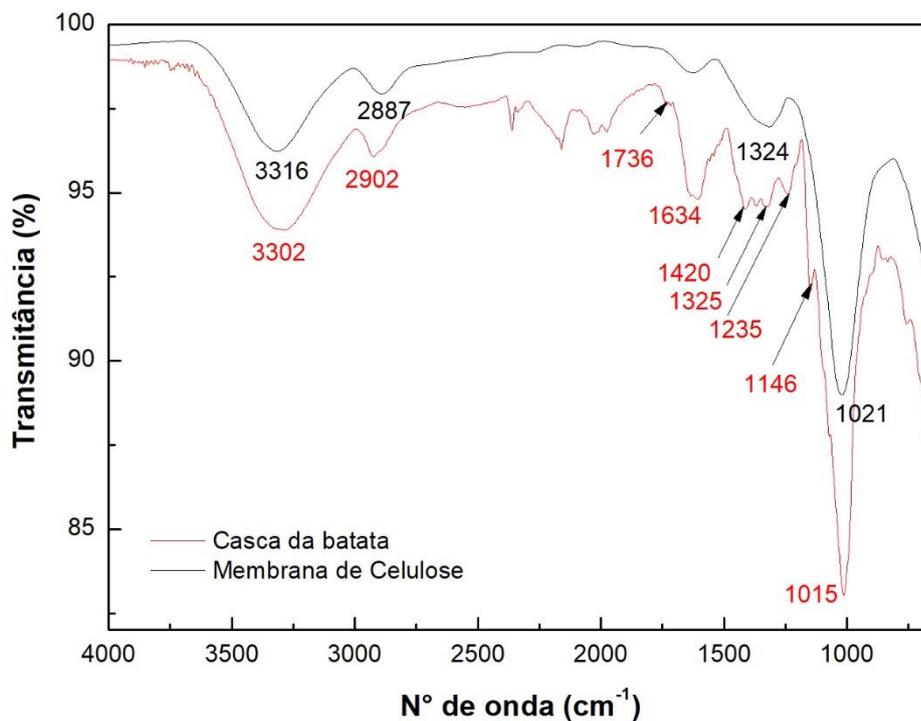


Figura 17: Espectros de FTIR da membrana de celulose e da casca da batata e suas principais bandas de absorção.

No espectro obtido para a casca da batata, foi verificado a presença de bandas referentes aos grupos funcionais dos quatro principais componentes da casca: celulose, hemicelulose, lignina e amido. Para a membrana, houve predominância dos grupos referentes à estrutura da celulose. Entretanto, algumas vibrações de estiramento e dobramento foram comuns para ambos os espectros, como: O-H (faixa de  $3300\text{ cm}^{-1}$ ) e C-H (faixa de  $2900\text{ cm}^{-1}$ ) (LIANG & MCDONALD, 2014).

Em  $1736\text{ cm}^{-1}$ , verificou-se o estiramento do C=O, presente nos grupamentos acetil e ácidos glucorônicos da hemicelulose (YANG *et al.*, 2007). Tratando-se da região de 1600-1400

$\text{cm}^{-1}$ , esta foi relacionada à vibração da ligação C=C dos anéis aromáticos, disponíveis na lignina (LIANG & MCDONALD, 2014). Além disso, em  $1235 \text{ cm}^{-1}$  houve estiramento do grupo C-O-C, que pode estar relacionado às ligações éter e éster, responsáveis pela forte associação entre a hemicelulose e a lignina na parede celular (ATSUSHI *et al.*, 1984; YANG *et al.*, 2007). Logo, como tais bandas não foram verificadas no espectro da membrana de celulose, é possível confirmar que o tratamento com NaOH e  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi eficaz na remoção da hemicelulose e da lignina.

Em ambos os espectros, foram observadas absorções na região de  $1324 \text{ cm}^{-1}$ , que se tratam de bandas típicas da celulose cristalina, relacionadas ao dobramento angular da ligação C-O-H (LUDUEÑA *et al.*, 2013). Em  $1146 \text{ cm}^{-1}$ , verificou-se a banda de deformação angular das ligações C-O de alcoóis primários (YANG *et al.*, 2007). A banda da ligação C-O-C, em torno de  $1000 \text{ cm}^{-1}$ , ocorreu tanto no material *in natura* quanto na membrana a base de celulose, sendo responsável pela vibração do anel de piranose (carboidratos) (LIANG & MCDONALD, 2014).

Resultados semelhantes foram observados por Chen *et al.* (2012) após análises FTIR de cascas de batata *in natura* e cascas tratadas com processo alcalino e hidrólise ácida, para a síntese de nanocristais de celulose. Segundo os autores, as bandas encontradas nos dois materiais, relacionaram-se às ligações O-H em  $3300\text{-}3500 \text{ cm}^{-1}$  e C-H em  $2900 \text{ cm}^{-1}$ . A existência de hemicelulose e lignina, apenas no espectro do material *in natura*, foi confirmada pelas vibrações dos grupos C=O (em  $1739 \text{ cm}^{-1}$ ) e C=C (em  $1514$  e  $1456 \text{ cm}^{-1}$ ), respectivamente. Finalmente, a faixa de  $800\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$  foi considerada como a região da impressão digital da celulose, indicando que tanto na ausência ou presença do tratamento químico, tal banda sempre esteve presente.

### 6.2.2 Análises do comportamento térmico (TGA)

A Figura 18 ilustra o perfil de degradação térmica para a casca da batata (material *in natura*) e para a membrana de celulose, em que as curvas de TGA representam a estabilidade térmica dos materiais e as curvas de DTGA referem-se às máximas perdas de massa dos componentes. As Tabelas 9 e 10 evidenciam os principais eventos térmicos e suas porcentagens de perdas de massa.

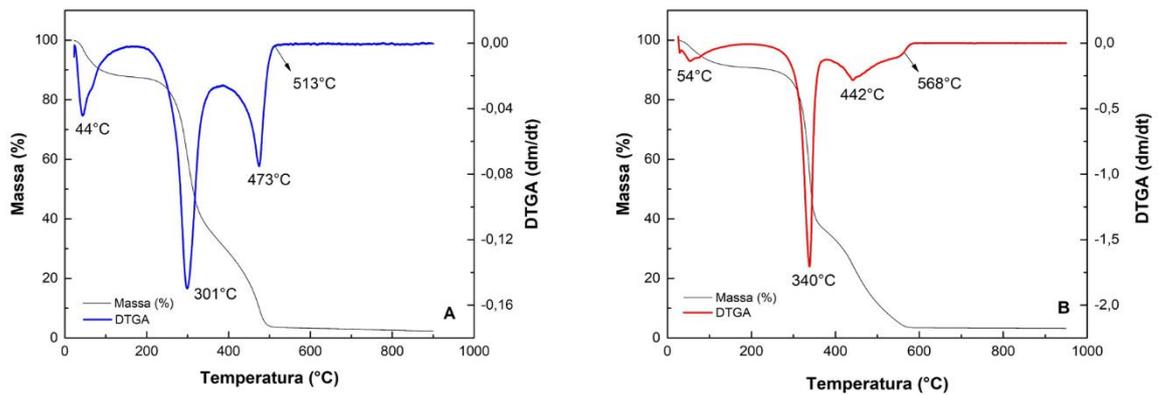


Figura 18: Perfil TGA/DTGA da casca da batata (A) e da membrana de celulose (B) a 10°C/min.

Tabela 9: Principais eventos térmicos e perdas de massa da casca da batata

<i>Material in Natura</i>			
Evento	Temperatura do Pico (°C)	Massa (%)	Atribuição
0 (25-164°C)	44	12,36	Umidade
1 (164-382°)	301	55,98	Amido, hemicelulose, celulose
3 (382-513°C)	473	28,01	Lignina
4 (513-900°C)	513	3,65	Resíduo
SOMA		100,00	

Tabela 10: Principais eventos térmicos e perdas de massa da membrana de celulose

<i>Membrana de Celulose</i>			
Evento	Temperatura do Pico (°C)	Massa (%)	Atribuição
0 (25-177°C)	54	9,06	Umidade
1 (177-379°C)	340	55,23	Celulose
2 (379-568°C)	442	31,91	Celulose
3 (568-950°C)	568	3,80	Resíduo
SOMA		100,00	

Em ambos os gráficos, o primeiro pico observado em torno de 50°C, na faixa de 25-170°C, foi atribuído à evaporação da água, representando uma perda de massa de aproximadamente 10% (Tabelas 9 e 10). Conforme reportado por Ludueña *et al* (2013), fibras naturais extraídas de resíduos agrícolas apresentam umidade em torno de 8-12%, já que se tratam de materiais hidrofílicos por natureza.

A degradação térmica dos principais componentes da casca da batata ocorre entre 280-

350°C para o amido, 220-315°C para a hemicelulose, 315-400°C para a celulose e 250-900°C para a lignina (Liang *et al.*, 2014). Portanto, a máxima perda de massa observada para a casca aconteceu em 301°C, atribuída à decomposição do amido, hemicelulose e celulose, simultaneamente (Figura 18). Este evento, que ocorreu entre 164-382°C, resultou em uma perda de quase 56% do material (Tabela 9). Ainda no mesmo gráfico, um pico em 473°C foi associado à degradação da lignina, cuja estrutura é a mais difícil de se decompor. Finalmente, a partir de 513°C, formou-se um resíduo de 3,65% que persistiu até 900°C, praticamente constante. Este resíduo está relacionado à formação de cinzas, proveniente do conteúdo carbônico da amostra (LUDUEÑA *et al.*, 2013).

Avaliando-se os perfis de TGA/DTGA dos componentes da biomassa separadamente, Yang *et al.* (2007) verificaram que a hemicelulose é o componente menos estável, decompondo-se entre 220-315°C, com máxima perda de massa ocorrendo em 268°C. A pirólise da celulose, por sua vez, ocorreu entre 315-400°C, evidenciado um pico máximo em 355°C. Para a lignina, sua degradação aconteceu lentamente em uma ampla faixa de temperatura, entre 140-900°C. Segundo os autores, diferenças estruturais nos três componentes justificam as variações térmicas observadas. Logo, a decomposição da hemicelulose a temperaturas mais baixas é explicada devido à sua estrutura ramificada, amorfa e heterogênea, que favorece a rápida perda de compostos da cadeia na forma de voláteis (CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, etc). Ao contrário da hemicelulose, a celulose possui cadeia homogênea, longa, cristalina e não ramificada, aumentando sua estabilidade térmica. Por fim, a complexa estrutura da lignina, repleta de anéis aromáticos, faz deste componente o mais difícil de ser degradado.

Tratando-se da decomposição da membrana, na faixa de 177-379°C houve perda de 55,23% da massa total (Tabela 10). Nessa região, um pico na temperatura de 340°C, atribuído a degradação da celulose, obteve destaque (Figura 18). Tal resultado está de acordo com o observado por Ludueña *et al.* (2013), já que a máxima taxa de decomposição da celulose nanowhisker extraída da palha de milho, casca de arroz e de uma variedade celulósica comercial ocorreu em 322, 314 e 349°C, respectivamente. Outro pico, embora com menor intensidade, foi observado a 442°C, podendo estar relacionado à decomposição final da cadeia de celulose. Desta forma, na faixa de 379-568°C, cerca de 32% do material foi degradado. Por fim, a formação de 3,80% de resíduo ocorreu a partir de 568°C.

Conforme Lakshmi *et al.* (2017), a decomposição térmica da celulose extraída da alga marinha *Ulva fasciata* obteve três estágios: perda de umidade entre 100-120°C; decomposição da celulose, através da remoção dos grupos hidroxila (-OH) e metil hidroxila (-CH<sub>2</sub>OH), em

200-340°C; e degradação da cadeia polimérica e do anel de piranose, na faixa de 340-665°C. Nos dois últimos estágios, perdas de massa semelhantes a este estudo também foram observadas pelos autores: 56 e 26,31%, respectivamente.

### 6.2.2.1 Energia de ativação da degradação térmica da membrana

A energia de ativação da degradação térmica da membrana ( $E_a$ ) foi determinada a partir do primeiro pico de máxima degradação térmica da celulose, nas temperaturas de 329, 340 e 350°C, com taxas de aquecimento de 5, 10, e 15°C/min, respectivamente. Os perfis térmicos (TGA/DTGA) das três taxas foram similares, apresentando perdas de massa relacionadas à evaporação da água, decomposição da celulose (em duas fases) e formação de resíduo ao final do processo de degradação térmica (Figura 19) (LUDUEÑA et al., 2013; LAKSHMI et al., 2017). Comparando as variações de temperatura dos picos obtidos por DTGA (Tabela 11), é possível observar que houve um deslocamento das curvas para à direita, à medida em que se aumentou a taxa de aquecimento.

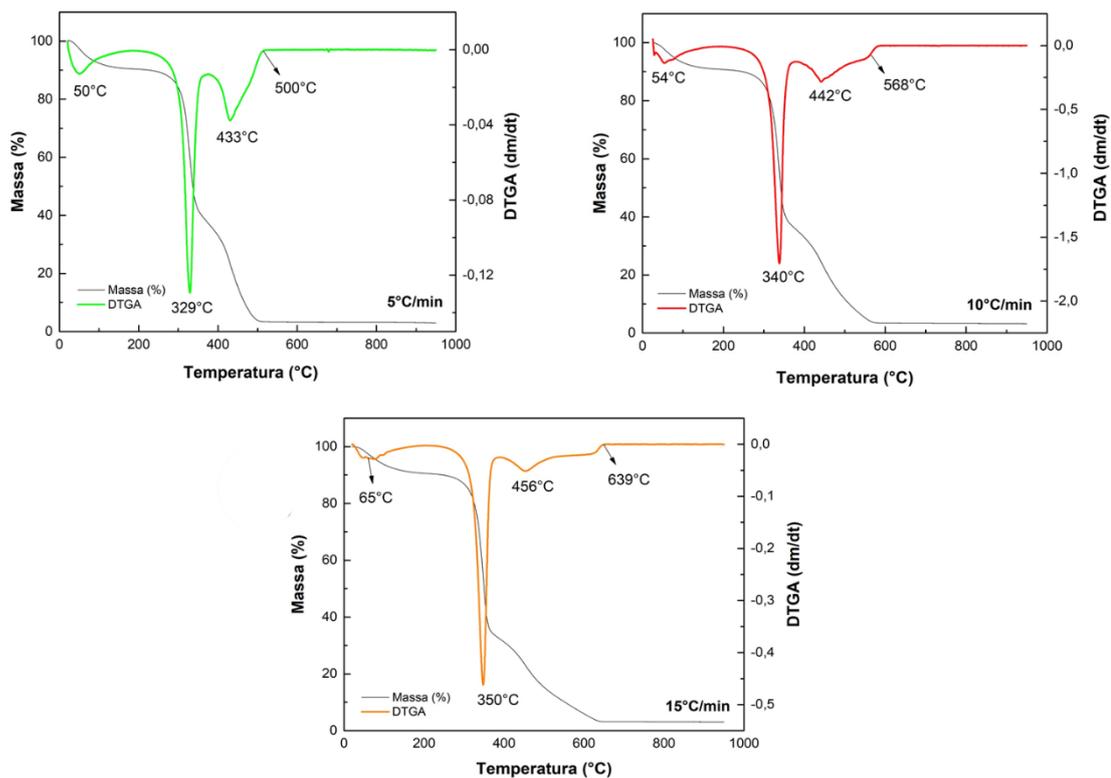


Figura 19: Perfis de degradação térmica (TGA/DTGA) da membrana de celulose nas taxas de 5, 10 e 15°C/min.

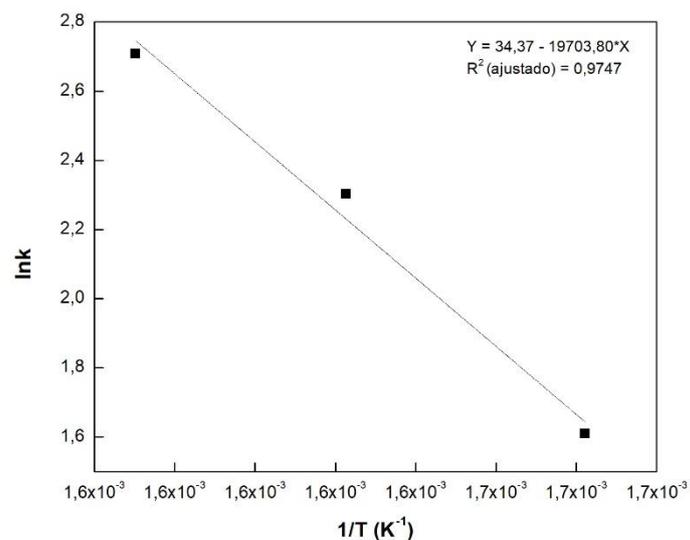
. Tabela 11: Temperaturas dos picos obtidos por DTGA e suas atribuições nas taxas de 5, 10 e 15°C/min

Temperaturas dos Picos (°C)				
Fluxo (°C/min)	Umidade	Celulose	Celulose	Resíduo
5	50	329	433	500
10	54	340	442	568
15	65	350	456	639

Conforme procedimento descrito no item 4.3.2.1, a  $E_a$  da degradação térmica da membrana foi determinada a partir do gráfico apresentado na Figura 20. Os dados para a construção deste gráfico estão resumidos na Tabela 12.

Tabela 12: Determinação das variáveis para o cálculo da energia de ativação ( $E_a$ ) da degradação térmica da membrana.

k (°C/min)	lnk	T (°C)	T (K)	1/T
5	1,6094	329	602	0,00166
10	2,3026	340	613	0,00163
15	2,7081	350	623	0,00161

Figura 20: Regressão linear para o cálculo da energia de ativação ( $E_a$ ) da degradação térmica da membrana.

Avaliando o coeficiente de correlação ( $R^2 = 0,9747$ ), verificou-se que a qualidade do ajuste linear foi bastante satisfatória (Figura 20). Além disso, comparando-se a equação da reta

com a equação 3, tem-se que o coeficiente angular  $\frac{E_a}{R} = 19703,80$ . Logo, a partir da constante universal dos gases ( $R = 8,314 \text{ J/Kmol}$ ), a  $E_a$  obtida foi de  $163,82 \text{ kJ/mol}$ , que trata-se da energia necessária para iniciar o processo de decomposição da celulose.

Resultados semelhantes também foram reportados por Pasangulapati *et al.* (2012). Neste estudo, os valores de energia de ativação da degradação térmica da celulose, hemicelulose e lignina foram de  $135,21$ ,  $118,54$  e  $67,62 \text{ kJ/mol}$ , respectivamente. Segundo os autores, as variações nas  $E_a$  estão relacionadas às diferenças na estrutura química dos componentes, que podem garantir maior ou menor estabilidade térmica, em determinadas faixas de temperatura.

Ainda no mesmo trabalho, foi observado que as  $E_a$  encontradas para a palha de trigo e a gramínea “switchgrass”, na zona de pirólise ativa entre  $200\text{-}400^\circ\text{C}$ , foram de  $100,7$  e  $103,7 \text{ kJ/mol}$ , respectivamente, não apresentando diferenças significativas em relação aos resultados obtidos para os componentes da biomassa separadamente. Outros valores encontrados na literatura para a  $E_a$  da degradação térmica de resíduos agrícolas, na faixa de temperatura onde ocorre máxima perda de massa ( $225\text{-}450^\circ\text{C}$ ), são:  $57,32 \text{ kJ/mol}$  para a palha de milho (KUMAR *et al.*, 2008) e  $107,6 \text{ kJ/mol}$  para o caule do algodão (SUN *et al.*, 2010), sendo que em ambas as análises se utilizou atmosfera de ar, com fluxo de  $10^\circ\text{C/min}$ .

### 6.2.3 Estudo do intumescimento da membrana

A Figura 21 evidencia a capacidade de intumescimento da membrana nos estágios iniciais de inchaço até seu equilíbrio em 60 minutos. Os dados necessários à construção deste gráfico estão reportados nos apêndices A, B e C.

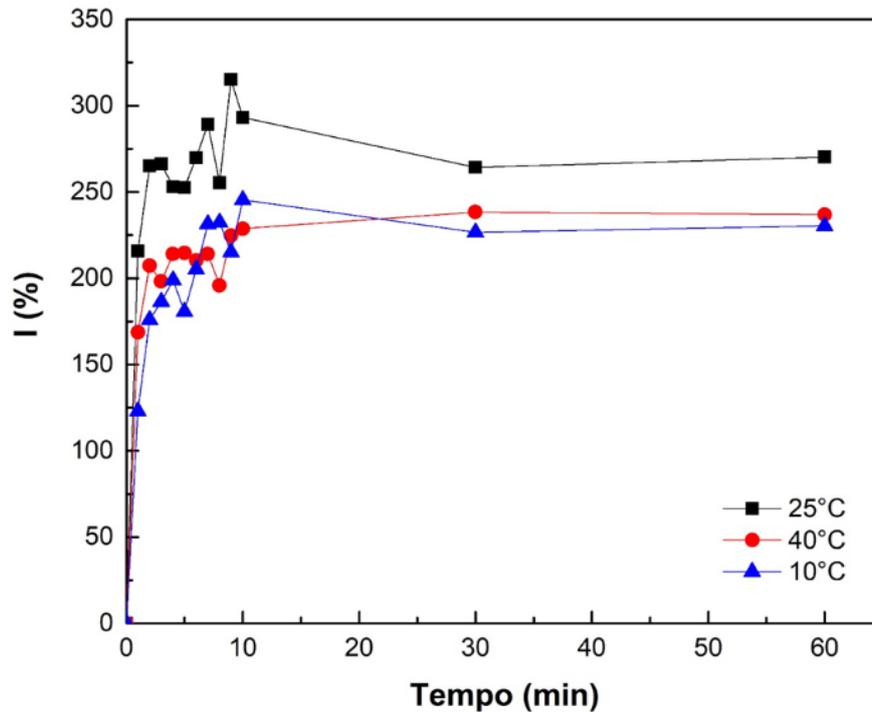


Figura 21: Grau de intumescimento (I) da membrana de celulose em soro fisiológico nas temperaturas de 40, 25 e 10°C em relação ao tempo (min).

Através da análise de variância de fator único (ANOVA *One-Way*), verificou-se que houve diferença significativa entre as médias das massas, indicando que o grau de intumescimento da membrana varia com a temperatura (°C) (tabela 13).

Tabela 13: Análise de variância de fator único (ANOVA *One-Way*) das médias das massas (g) após hidratação da membrana.

Fonte da variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (gl)	Quadrado Médio (QM)	Valor F*	p-valor**	F crítico
Entre grupos	0,001	2,000	0,000	13,064	0,0001	3,259
Dentro dos grupos	0,001	36,000	0,000			
Total	0,002	38,000				

\*Como  $F > F$  crítico, rejeitamos  $H_0$  (médias iguais) em um nível de confiança de 95%.

\*\* Valores significativos a 95% de confiança estão destacados em vermelho (p-valor < 0,05)

De acordo com os resultados encontrados, houve maior intumescimento na temperatura de 25°C. Para as temperaturas de 40 e 10°C, observou-se perfil de inchaço similar. Após 60 minutos de experimento, os graus de intumescimento foram de 230,4, 270,3 e 236,9% para 10, 25 e 40°C, respectivamente. Tais valores aproximam-se de resultados reportados na literatura.

Segundo, Gustaite *et al.* (2015), esponjas de celulose regenerada apresentaram grau de intumescimento de 210%, a 37°C, após 24h em pseudo fluido extracelular. Os autores observaram que o equilíbrio foi atingido após 3h, embora depois de 10 minutos, o grau de intumescimento já fosse de 132%. Além disso, eles enfatizam que no tratamento de feridas é muito importante que o curativo possa absorver o exsudato de forma rápida e controlada, a fim de evitar a maceração da pele, entre outras complicações, durante o processo de cicatrização.

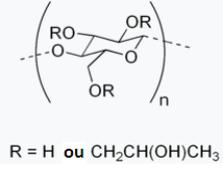
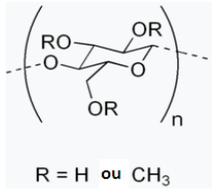
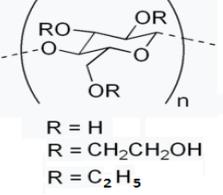
Tratando-se da celulose bacteriana, seu grau de intumescimento em água deionizada foi de 202,3%, a 25°C, após equilíbrio de 7h, conforme reportado por Chang *et al.* (2016). Para os autores, a hidrofiliabilidade do material associada à sua constituição rica em poros, favorece a absorção de água.

Embora a estrutura química da celulose apresente um elevado número de grupos hidroxila que lhe conferem caráter hidrofílico, suas fortes ligações de hidrogênio intra e intermoleculares promovem o empacotamento das cadeias, fazendo com que este polímero seja insolúvel em água. Nesse sentido, sabendo que redes poliméricas tridimensionais com alto grau de intumescimento e que não se dissolvem no solvente são chamadas de hidrogéis, é possível dizer que a celulose assume um caráter de hidrogel. Os hidrogéis podem ser de origem natural ou sintética, sendo classificados em hidrogéis químicos ou físicos, de acordo com a natureza da rede formada durante a reticulação (CHANG & ZHANG, 2011). Logo, os hidrogéis de celulose são obtidos a partir da reticulação física das cadeias, devido às interações entre as ligações de hidrogênio (JAIN *et al.*, 2013).

A literatura mostra que a capacidade de intumescimento dos hidrogéis depende de fatores externos, como: pH, força iônica e temperatura. Atualmente, os hidrogéis sensíveis à temperatura possuem grande atenção devido à sua capacidade para intumescerem ou desintumescerem, como resultado de uma mudança da temperatura no meio (CHANG & ZHANG, 2011). Hidrogéis que apresentam uma sensibilidade negativa à temperatura (ou seja, precipitam ou colapsam após o aquecimento) exibem uma separação de fase da solução com a temperatura. Tal temperatura é conhecida como Temperatura de Solução Crítica Inferior (*Lower Critical Solution Temperature - LCST*). Desta forma, acima da LCST, o hidrogel precipita ou colapsa, tornando-se mais hidrofóbico e insolúvel, enquanto que abaixo da LCST, o hidrogel encontra-se em uma conformação estendida e, portanto, solúvel e mais intumescido (JAIN *et al.*, 2013).

Ainda que a celulose não apresente transição de fase sol-gel com a temperatura, devido à sua insolubilidade em água, éteres de celulose - preparados por eterificação dos grupos hidroxila das unidades de celulose - produzem compostos solúveis em água (Tabela 14). Tais derivados de celulose podem apresentar transição sol-gel, resultando em polímeros sensíveis à temperatura (JAIN *et al.*, 2013).

Tabela 14: Derivados de celulose sensíveis a temperatura: para temperaturas abaixo da LCST ( $T < LCST$ ), tem-se que a celulose é solúvel em água; para temperaturas superiores a LCST ( $T > LCST$ ), a celulose é insolúvel em água.

Celulose e Derivados	Estrutura Química	LCST
Hidroxipropil celulose (HPC)	 <p>R = H ou <math>\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3</math></p>	40-45°C (FELLER & WILT, 1990); 65 – 66°C (JAIN et al., 2013)
Metil celulose (MC)	 <p>R = H ou <math>\text{CH}_3</math></p>	56°C (FELLER & WILT, 1990); 60 – 80°C (JAIN et al., 2013)
Etil hidroxietil celulose (EHEC)	 <p>R = H R = <math>\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}</math> R = <math>\text{C}_2\text{H}_5</math></p>	50°C (FELLER & WILT, 1990); 35°C (JAIN et al., 2013)

Diante do exposto e a partir dos resultados encontrados, verificou-se que a membrana de celulose é sensível à temperatura. Inicialmente, foi observado um aumento no intumescimento, quando a temperatura se elevou de 10 para 25°C. Entretanto, na temperatura de 40°C, a membrana de celulose manifestou caráter hidrofóbico, com diminuição do intumescimento. Pelo fato da celulose ser insolúvel em água, não foram encontrados estudos na literatura referentes ao efeito da temperatura na solubilização. Porém, os resultados aqui apresentados evidenciam a existência de conformações na rede polimérica da celulose, fazendo com que os grupos hidrofílicos (-OH) fiquem menos expostos a superfície, à medida que a temperatura aumenta. Portanto, pelo comportamento observado, houve decréscimo da hidrofiliidade do material com o aumento da temperatura. Este comportamento, ainda que não seja uma clássica transição térmica sol-gel, pode ser considerado como uma transição térmica da rede entrecruzada de uma conformação estendida (hidrofílica), a uma conformação colapsada (hidrofóbica).

Os parâmetros do processo de difusão obtidos durante o estudo do intumescimento para o modelo de Fick ( $n$ ,  $k$  e  $R^2$ ) e para a determinação do coeficiente de difusão ( $D$  e  $R^2$ ) estão esquematizados na Tabela 15.

Tabela 15: Regressão linear para obtenção dos parâmetros do modelo de Fick ( $n$ ,  $k$  e  $R^2$ ) e para determinação do coeficiente de difusão ( $D$  e  $R^2$ ) da membrana de celulose, nas temperaturas de 10, 25 e 40°C.

Temperatura (°C)	$n$	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	* $R^2$	$D$ ( $10^{-10}$ ) ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )	** $R^2$
10	0,17	0,70	0,9444	3,46	0,9704
25	0,10	0,85	0,9544	25,9	0,9984
40	0,08	0,81	0,9357	4,17	0,9700

\*Modelo de Fick; \*\*Coeficiente de Difusão

Para os valores de  $n$  encontrados, é possível inferir que a difusão durante o processo de intumescimento da membrana, nas três temperaturas citadas, não seguiu o modelo de Fick. De acordo com Păvăloiu *et al.* (2015), no caso de  $n < 0,5$ , o mecanismo de difusão segue um modelo pseudo-Fickiano.

A partir dos coeficientes de difusão encontrados (Tabela 15), calculou-se a energia de ativação da difusão ( $E_D$ ), necessária para promover o intumescimento da membrana. Entre 10 e 25°C, a  $E_D$  foi de 94,5 kJ/mol, indicando que o sistema apresentou uma elevada barreira energética para o processo de expansão das cadeias e intumescimento. Em outras palavras, observou-se que a 10°C, a mobilidade e o grau de liberdade do polímero são menores, pois, a barreira energética a ser atingida para o sistema manifestar uma conformação estendida e com maior grau de liberdade (a 25°C) é alta.

Entretanto, entre 10 e 40°C, o valor encontrado para  $E_D$  foi bem menor, 4,58 kJ/mol, confirmando uma transição de fase térmica próxima de 40°C, devido a um colapso na conformação da cadeia polimérica. Isso significa que em torno de 40°C, a cadeia polimérica volta a ter uma conformação menos estendida. Tal conformação é próxima daquela verificada a 10°C. Desta forma, a barreira energética entre 10 e 40°C é baixa, pois o sistema polimérico em ambas as temperaturas apresenta uma conformação semelhante, com menor grau de liberdade e, portanto, não favorável à retenção de água na estrutura.

### 6.2.4 Análise da cristalinidade por DRX

A Figura 22 mostra o espectro de difração da membrana de celulose. A Tabela 16 reúne os ângulos  $2\theta$  dos picos de difração observados no espectro DRX. Os ângulos  $2\theta$  encontrados para as amostras foram comparados com os da literatura, confirmando que a celulose extraída da casca de batata apresenta padrão cristalino semelhante ao da celulose do tipo I e II (FORD *et al.*, 2010).

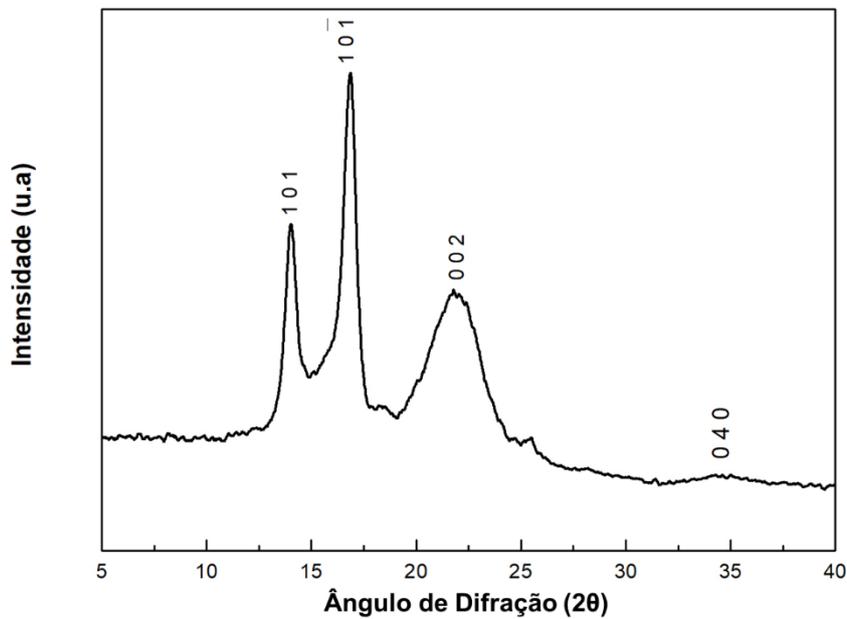


Figura 22. Espectro DRX da membrana de celulose

Tabela 16: Valores comparativos de índice de Miller, ângulo  $2\theta$  e distância interplanar ( $d$ ) da membrana de celulose e da celulose do tipo I e tipo II (FORD *et al.*, 2010).

Material	1 0 1		1 0 $\bar{1}$		0 2 1		0 0 2		0 4 0
	$2\theta$	$d(\text{Å})$	$2\theta$	$d(\text{Å})$	$2\theta$	$d(\text{Å})$	$2\theta$	$d(\text{Å})$	$2\theta$
Membrana de celulose	14,11	6,27	16,91	5,24	-	-	21,83	4,07	34,81
Celulose I	14,70	6,01	16,60	5,35	20,60	4,31	22,50	3,94	34,70
Celulose II	12,30	7,19	20,10	4,42	-	-	21,90	4,06	34,70

A elevada concentração de grupos hidroxilas na cadeia linear da celulose favorece inúmeras interações intra e intermoleculares, conferindo carácter cristalino à sua estrutura. Desta forma, a celulose apresenta quatro arranjos cristalinos diferentes, sendo eles: celulose I, celulose II, celulose III e celulose IV, com padrões cristalinos bem definidos por DRX (PARK *et al*, 2010). A estrutura cristalina da celulose do tipo I é a forma mais abundante encontrada na natureza, enquanto a estrutura cristalina da celulose do tipo II pode ser obtida após tratamento alcalino (PARK *et al*, 2010).

Os resultados verificados na Tabela 16 demonstram que a estrutura cristalina da celulose extraída da casca de batata através do tratamento alcalino, seguido da etapa de branqueamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, consegue manter a estrutura cristalina tipo I, característica da celulosa nativa. Porém, observamos no espectro de DRX da celulose extraída, ausência do pico correspondente ao plano cristalográfico [0 2 1]. Tal fato sugere que uma fração da celulose após tratamento químico cristaliza na estrutura cristalina tipo II.

Pelo espectro DRX, também observou-se dois picos de reflexão de baixa intensidade: o primeiro em  $2\theta = 18,47^\circ$ , referente à fase amorfa da celulose (PARK *et al*, 2010) e o segundo em  $2\theta = 25,44^\circ$ , que foi igualmente observado por Kumar e colaboradores (2014), em fibra nativa proveniente do bagaço da cana de açúcar, sem prévio tratamento.

A partir do espectro de DRX, a cristalinidade da celulose extraída da casca da batata foi calculada pelo método Segal, cujo valor encontrado foi de 73,42 %. Tal resultado demonstra a eficácia do tratamento utilizado para obtenção da membrana de celulose, pois mesmo após extração com NaOH e branqueamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a estrutura cristalina da celulose foi preservada.

Comparando os resultados aqui apresentados com aqueles reportados por Chen *et al*. (2012), notou-se que a celulose extraída da casca da batata, utilizando tratamento alcalino 0,5 N e clorito de sódio 2,3% (m/m), também apresentou os principais picos de refração referentes à estrutura cristalina da celulose do tipo I ( $2\theta = 14,7^\circ$ ,  $16,4^\circ$  e  $22,6^\circ$ ). No entanto, o índice de cristalinidade calculado pelo método de Segal foi maior (85%), pois o trabalho citado também contou com uma etapa de hidrólise ácida para obtenção da celulose nanocristalina.

### 6.2.5 Análises da morfologia (MEV)

A figura 23 representa a morfologia da superfície da casca da batata e da membrana de celulose. Em seu estado natural, a micrografia da casca da batata apresentou caráter complexo e heterogêneo, em concordância com a estrutura da parede celular das plantas. Além disso, na mesma imagem, notou-se a presença de elementos circulares, que sugerem a presença de grânulos de amido.

Através da análise MEV da superfície da membrana, é possível inferir que houve predominância das fibras de celulose. Tal avaliação está diretamente relacionada aos resultados encontrados por FTIR, TGA e DRX, confirmando que o tratamento com hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio foi capaz de romper a rígida estrutura da biomassa, removendo hemicelulose e lignina para a obtenção de celulose purificada.

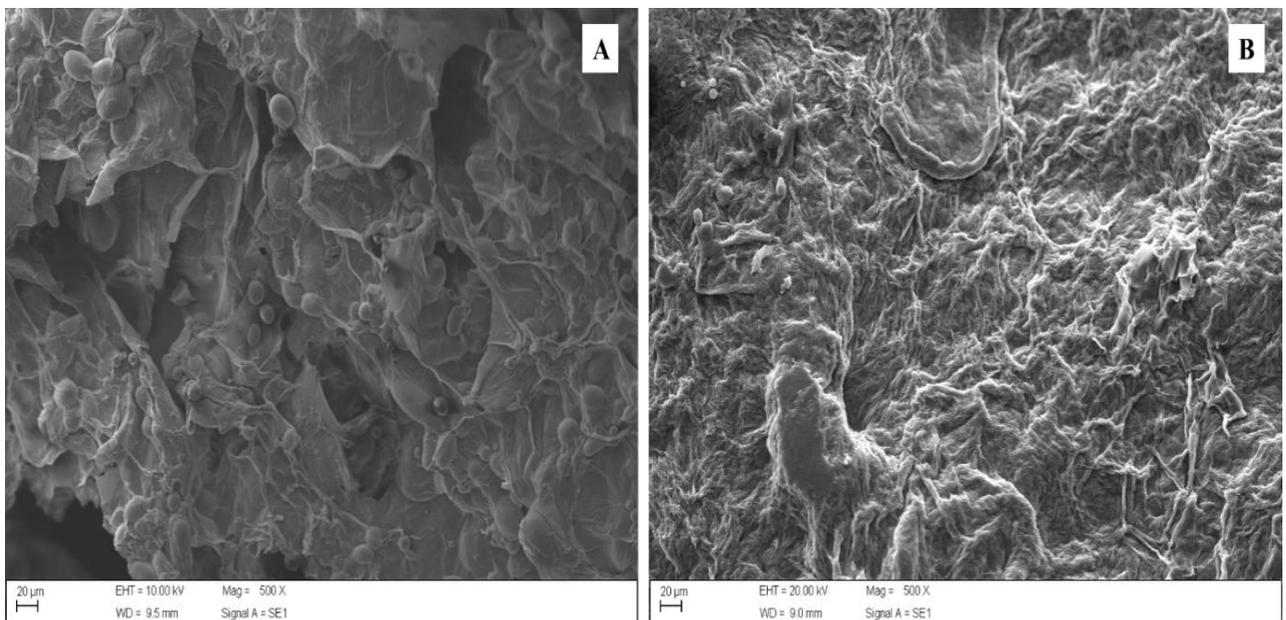


Figura 23: Imagens obtidas através do MEV da casca da batata (A) e da membrana de celulose (B)

## 6.3 Caracterização do extrato de folhas de gerânio (*Pelargonium zonale*)

### 6.3.1 Análises por UV-visível e FTIR

O espectro UV-vis do extrato aquoso das folhas de gerânio é mostrado na Figura 24, onde pôde-se observar duas bandas. A primeira ocorreu em torno de 214 nm, sendo atribuída à transição eletrônica  $n \rightarrow \sigma^*$ , presente em compostos saturados que contém heteroátomos (oxigênio, nitrogênio, enxofre e halogênio) (PRETSCH, *et al.* 2015). Tal banda pode estar relacionada à presença dos grupos funcionais álcool (-OH) no extrato. A segunda banda verificada em 274 nm, corresponde à transição eletrônica  $n \rightarrow \pi^*$ , encontrada no grupo funcional carbonila (C=O) dos aldeídos (PRETSCH, *et al.* 2015). Ambos os grupos funcionais citados estão presentes nos compostos que constituem o extrato das folhas de gerânio. Potencialmente, os grupos funcionais álcoois e aldeídos podem oxidar-se, sendo assim responsáveis pela redução dos íons prata.

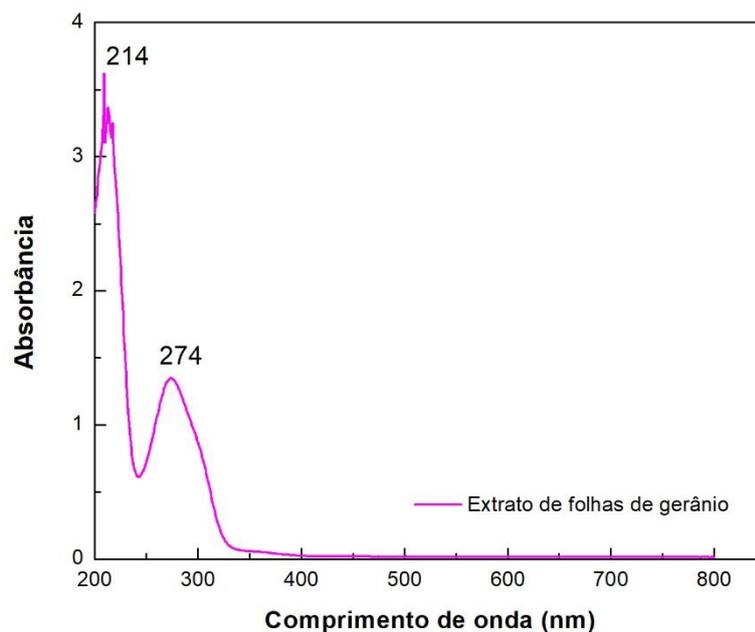


Figura 24. UV-vis do extrato aquoso das folhas de gerânio

A partir da análise do espectro FTIR abaixo (Figura 25) foi possível identificar as principais ligações presentes nas biomoléculas do extrato das folhas de gerânio, responsáveis pela redução dos íons prata e estabilização das Np-Ag.

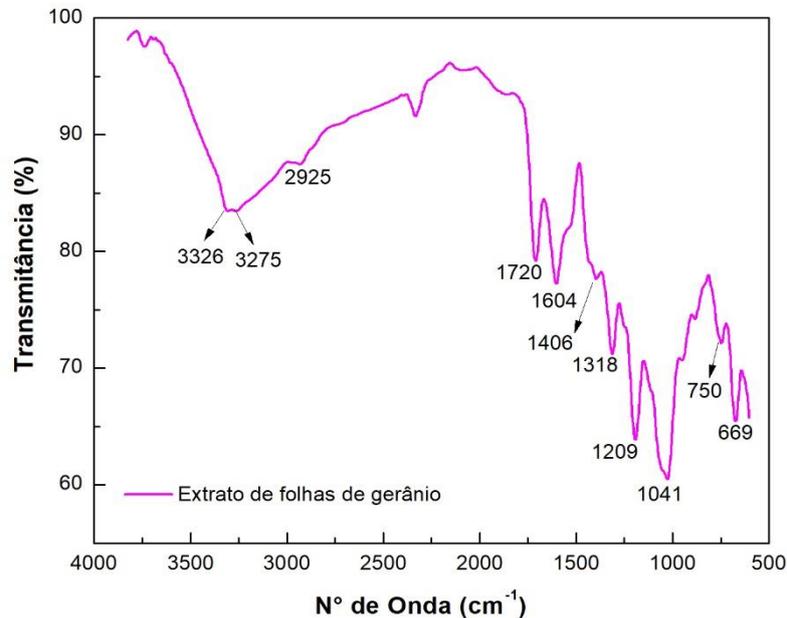


Figura 25: Espectros de FTIR do extrato das folhas de gerânio e suas principais bandas de absorção.

Na região de 3326-3275  $\text{cm}^{-1}$ , observou-se uma banda larga que pode estar associada à sobreposição das vibrações de estiramento dos seguintes grupos: hidroxil (-OH), presentes nas cadeias poliméricas de polifenóis e flavonóides; e amina (-NH), encontrada nas proteínas (RUBEN *et al.*, 2018). Em 2925  $\text{cm}^{-1}$ , verificou-se o estiramento das ligações C-H das cadeias carbônicas. A presença de carbonila no extrato (C=O) foi confirmada a partir dos sinais entre 1720-1318  $\text{cm}^{-1}$  (FRANCO-ROMANO *et al.*, 2014). Em 1209-1041  $\text{cm}^{-1}$ , observou-se estiramento C-O dos grupos álcool e éter, enquanto que as bandas em 750-669 indicaram presença de anéis aromáticos substituídos (FRANCO-ROMANO *et al.*, 2014).

De acordo com a literatura, o extrato de folhas de gerânio contém grande quantidade de terpenóides (citronelol e geraniol) e proteínas, que são responsáveis pela biossíntese das Np-Ag. Desta forma, é possível que os terpenóides contribuam para a redução dos íons prata, sendo oxidados a grupos carbonila, enquanto as proteínas favorecem no processo de estabilização das nanopartículas (SHANKAR *et al.*, 2003).

### 6.3.2 Biossíntese das Np-Ag em meio aquoso

A Figura 26 mostra os espectros de absorção no UV-visível durante a biossíntese das Np-Ag, a partir da redução dos íons  $\text{Ag}^+$  em meio aquoso, contendo extrato de folhas de gerânio (*Pelargonium zonale*) e  $\text{AgNO}_3$  (3 mM), a  $25^\circ\text{C}$ . O extrato foi utilizado como meio redutor e estabilizante das nanopartículas. Pelas análises de UV-visível, foi possível identificar o crescimento das Np-Ag através das bandas de absorção em 370 e 470 nm. A presença dessas duas bandas no espectro confirma o reconhecimento da região da banda de ressonância de plasmon de superfície (RPS) para as Np-Ag. Em trabalho similar reportado por Shankar *et al.* (2003), observou-se que a banda de RPS para as Np-Ag formadas ocorreu em um valor de comprimento de onda máximo de 440 nm. Além disso, também se verificou uma banda de absorção menos acentuada em 370 nm, apresentando-se como um ombro no espectro de UV-visível, após quatro horas de reação. Segundo os autores, tais bandas em 370 e 440 correspondem a diferentes tipos de vibrações das ondas de plasmon, sendo denominadas transversais e longitudinais, respectivamente.

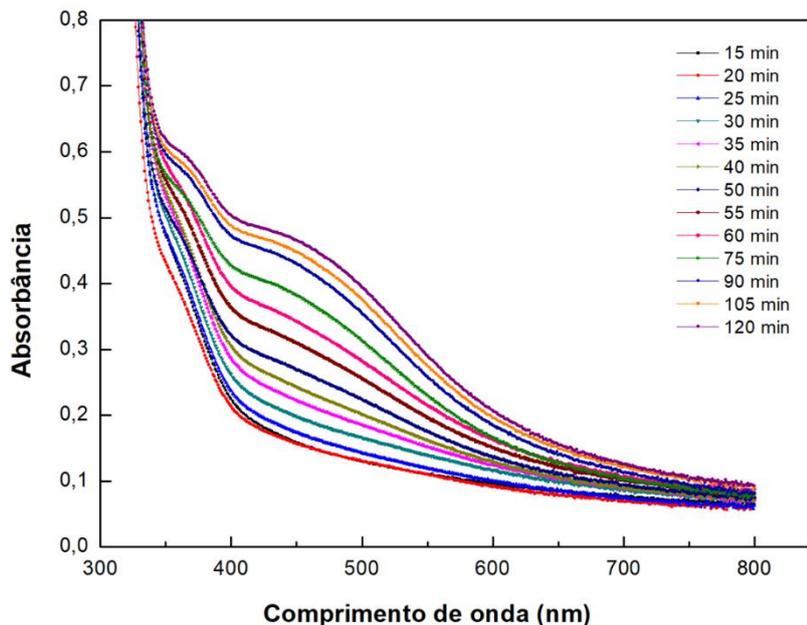


Figura 26: Espectros de absorção no UV-visível durante a biossíntese das Np-Ag ao longo do tempo, utilizando extrato de folhas de gerânio (*Pelargonium zonale*) e  $\text{AgNO}_3$  (3 mM), a  $25^\circ\text{C}$ .

Durante o tempo de biossíntese (2 horas), também se verificou uma mudança de coloração da solução de amarelo claro para marrom, indicando o crescimento das Np-Ag (Figura 27). Tal fato coincide com o reportado na literatura, já que a mudança de cor está

relacionada à excitação da superfície de plasmon nas nanopartículas metálicas (MULVANEY, 1996).

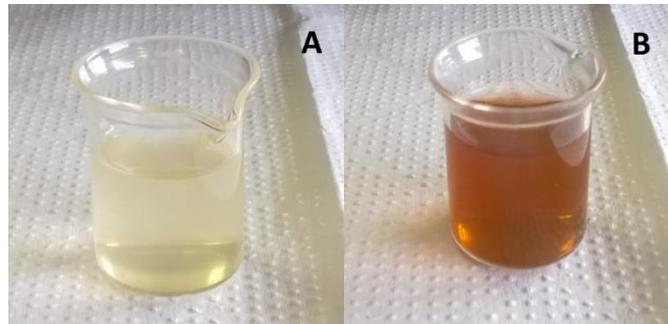


Figura 27: Início da biossíntese das Np-Ag em A (tempo 0 min). Fim da biossíntese das Np-Ag em B (tempo 120 min).

Conforme literatura, o pico referente à  $\sim 298$  nm no espectro de UV-visível corresponde à prata iônica ( $\text{Ag}^+$ ) (SHARMA *et al.*, 2012). Tal pico pode ser observado na Figura 28, quando apenas a solução de  $\text{AgNO}_3$  foi submetida à análise. Desta forma, devido à identificação das bandas de RPS em 370 e 470 nm (Figura 26), concluímos que em meio contendo extrato de gerânio e  $\text{AgNO}_3$  houve redução de  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  e, portanto, biossíntese das Np-Ag. Para avaliar a formação das nanopartículas na matriz de celulose, estudos posteriores envolvendo a caracterização e liberação das Np-Ag utilizando o biocompósito FC-Np/Ag serão apresentados na sequência, de modo a confirmar a biossíntese das Np-Ag *in situ*.

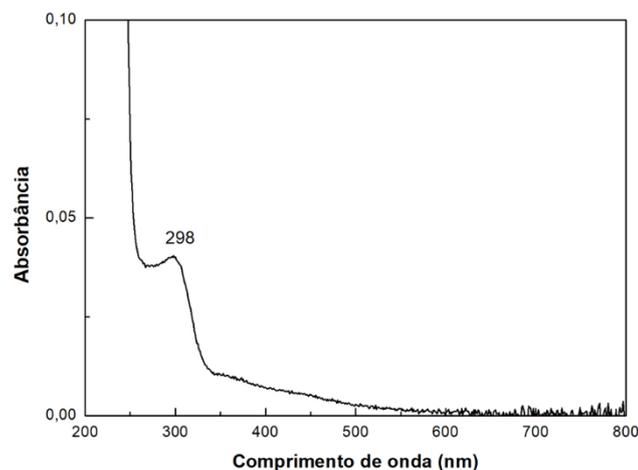


Figura 28: Espectro de absorção no UV-visível de solução de  $\text{AgNO}_3$  (3 mM), a 25°C.

## 6.4 Caracterização do biocompósito FC/Np-Ag

### 6.4.1 Análises da morfologia (MEV/EDS)

A Figura 29 mostra os biocompósitos FC/Np-Ag obtidos a partir da metodologia descrita no item 5.2.3. À medida em que se aumentou a concentração da solução de  $\text{AgNO}_3$ , verificou-se que a coloração dos biocompósitos passou de amarelo claro para marrom, indicando tanto a redução do sal de prata em Np-Ag, quanto o aumento de seu conteúdo nas membranas de celulose (LI *et al.*, 2015; SIVARANJANA *et al.*, 2017).

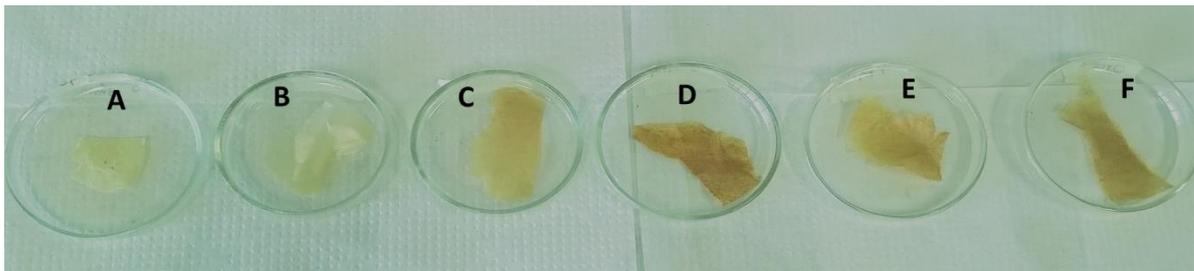


Figura 29: Biocompósitos FC/Np-Ag. As amostras foram preparadas após 24 horas de intumescimento no extrato de gerânio e 48 horas intumescidos em solução de 0,001 (B), 0,002 (C), 0,003 (D), 0,004 (E) e 0,005 (F) mol/L de  $\text{AgNO}_3$ . Para o branco (A), o intumescimento inicial foi feito com água destilada, seguido de intumescimento em solução de 0,003 mol/L  $\text{AgNO}_3$  por 48 horas.

A presença de Ag nos biocompósitos foi verificada por análises de MEV/EDS e, posteriormente, confirmada por DRX. Além da prata, a Figura 30 ilustra que os principais elementos químicos presentes na superfície dos biocompósitos foram o carbono e o oxigênio, encontrados na celulose. A presença de Ag também foi observada na superfície da amostra em que não houve o intumescimento inicial no extrato de gerânio, mas sim em água destilada. Segundo Li *et al.* (2015), as fibras de celulose quando intumescidas podem funcionar como um micro reator para a síntese de Np-Ag, pois apresentam muitos grupos  $-\text{OH}$ , capazes de reduzir  $\text{Ag}^+$  em Ag. Nesse sentido, os autores mergulharam fibras de celulose em solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  (1, 5, 25, 125 e 250 mM), sob aquecimento de  $80^\circ\text{C}$  a 24 horas, obtendo-se Np-Ag com diâmetros entre 7,2 a 12,5 nm. Além disso, também foi reportado que à medida em que se aumentava a concentração de  $\text{AgNO}_3$ , maior era o diâmetro das Np-Ag e o conteúdo de Ag na celulose.

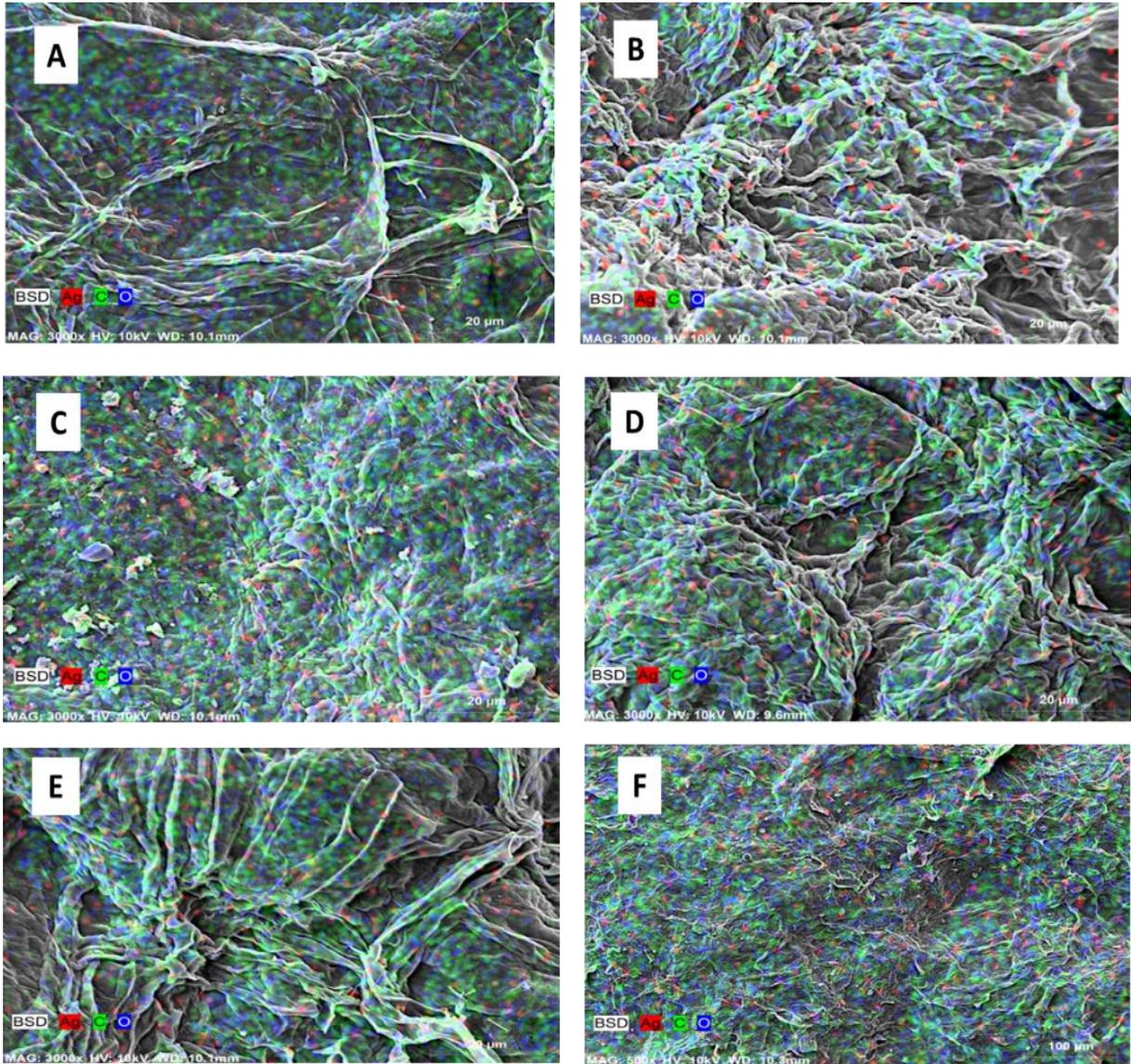


Figura 30: Imagens MEV/EDS da superfície dos biocompósitos FC/Np-Ag. As amostras foram preparadas após 24 horas de intumescimento no extrato de gerânio e 48 horas intumescidos em solução de 0,001 (B), 0,002 (C), 0,003 (D), 0,004 (E) e 0,005 (F) mol/L de  $\text{AgNO}_3$ . A imagem (A) corresponde à amostra branco, intumescida em água destilada por 24 horas e depois em solução de  $\text{AgNO}_3$  (0,003 mol/L) por 48 horas.

### 6.4.2 Análise da microestrutura cristalina (DRX)

A Figura 31 ilustra comparativamente o espectro DRX da membrana de celulose e de todos os biocompósitos e seu respectivo branco da prata (sem adição de extrato), preparados conforme item 5.2.3. A Tabela 17 resume os ângulos  $2\theta$  dos picos de difração observados nos espectros DRX apresentados na Figura 31.

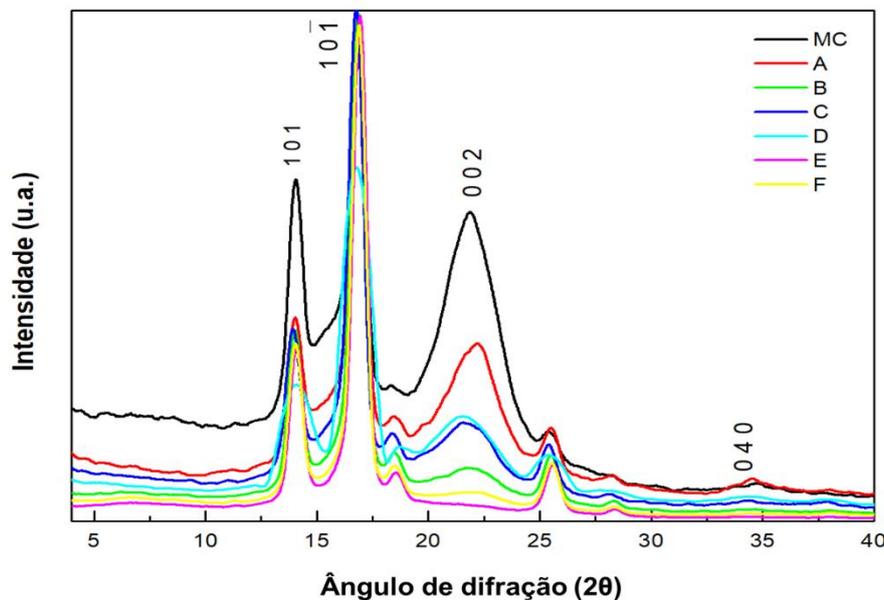


Figura 31: Espectro DRX da membrana de celulose (MC), branco da prata (A) e dos biocompósitos FC/Np-Ag, intumescidos em 0,001 (B), 0,002 (C), 0,003 (D), 0,004 (E) e 0,005 (F) mol/L de  $\text{AgNO}_3$ .

Tabela 17: Valores comparativos de índice de Miller, ângulo  $2\theta$ , distância interplanar (d) e grau de cristalinidade relativo (C%) da membrana de celulose (MC), branco da prata (A) e dos biocompósitos FC/Np-Ag, intumescidos em 0,001 (B), 0,002 (C), 0,003 (D), 0,004 (E) e 0,005 (F) mol/L de  $\text{AgNO}_3$ .

Amostra	1 0 1		1 0 $\bar{1}$		0 0 2		0 4 0		C (%)
	2 $\theta$	d(Å)	2 $\theta$	d(Å)	2 $\theta$	d(Å)	2 $\theta$	d(Å)	
MC	14,11	6,27	16,91	5,24	21,83	4,07	34,81	2,58	73,42
A	14,04	6,30	16,85	5,26	22,16	4,01	34,50	2,60	60,16
B	14,02	6,31	16,85	5,26	21,95	4,05	34,46	2,60	-
C	13,96	6,34	16,76	5,29	21,65	4,10	34,46	2,60	37,98
D	14,09	6,28	16,76	5,29	21,65	4,10	34,46	2,60	58,29
E	14,09	6,28	16,94	5,23	-	-	34,46	2,60	-
F	14,09	6,28	16,88	5,25	22,01	4,04	34,46	2,60	-

Os resultados sugerem que o perfil cristalino dos biocompósitos FC/Np-Ag não foram modificados, apresentando espectros DRX semelhantes à da membrana de celulose. No entanto,

observou-se diminuição da cristalinidade nas amostras intumescidas em solução contendo  $\text{Ag}^+$ . Tal fato sugere que a inserção das Np-Ag na matriz de celulose, através da biossíntese *in situ* pela presença do extrato vegetal, afeta a organização das cadeias de celulose e, conseqüentemente, seu grau de cristalinidade.

Em trabalho reportado por Sivaranjana e colaboradores (2017), verificou-se que a cristalinidade dos nanocompósitos de celulose/Np-Ag diminuiu quando comparada à matriz de celulose. Segundo os autores, a inserção de Np-Ag nos filmes, feita através da biossíntese *in situ* utilizando extrato de folhas de *Cassia Alata*, foi responsável pelo rearranjo das cadeias de celulose e conseqüente diminuição da cristalinidade. O mesmo também foi observado por Sadanand *et al* (2016), ao estudar espectros DRX de nanocompósitos de celulose/Np-Ag, cuja biossíntese das nanopartículas utilizou extrato de folhas de *Ocimum Sanctum* como agente redutor.

Para determinar o tamanho das Np-Ag sintetizadas, o espectro DRX foi analisado na faixa  $2\theta$  entre  $35-90^\circ$ , representado pela Figura 32. Os parâmetros índice de Miller, ângulo  $2\theta$  e distância interplanar são mostrados na Tabela 18.

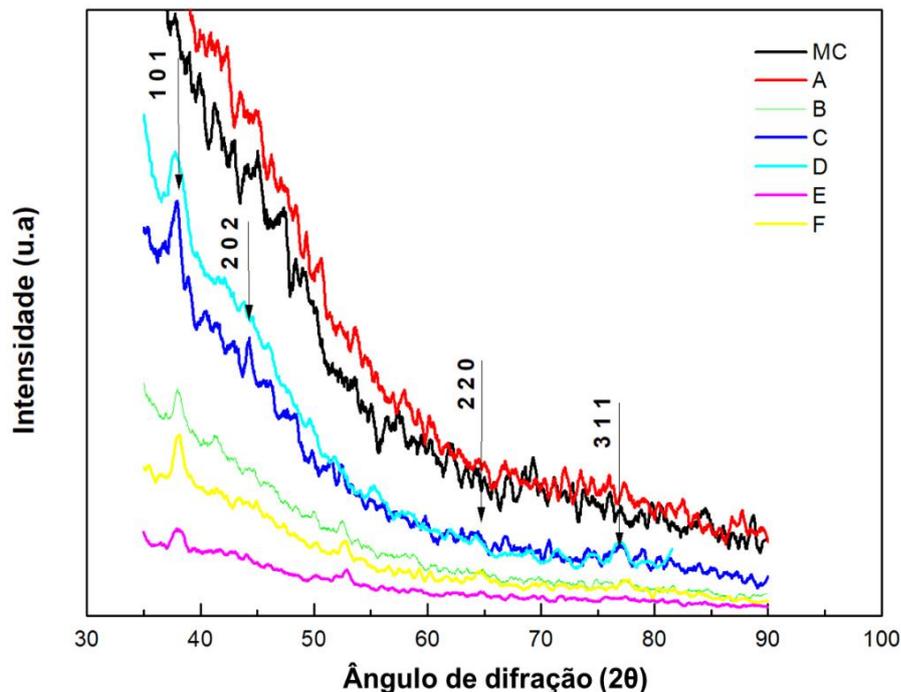


Figura 32: Espectro DRX entre  $35-90^\circ$  da membrana de celulose (MC), branco da prata (A) e dos biocompósitos FC/Np-Ag, intumescidos em 0,001 (B), 0,002 (C), 0,003 (D), 0,004 (E) e 0,005 (F) mol/L de  $\text{AgNO}_3$ .

Tabela 18: Valores comparativos do índice de Miller, ângulo  $2\theta$  e distância interplanar (d) dos biocompósitos FC/Np-Ag, intumescidos em 0,001 (B), 0,002 (C), 0,003 (D), 0,004 (E) e 0,005 (F) mol/L de  $\text{AgNO}_3$ .

Amostra	1 0 1		2 0 2		2 2 0		3 1 1	
	$2\theta$	d(Å)	$2\theta$	d(Å)	$2\theta$	d(Å)	$2\theta$	d(Å)
B	38,01	2,37	-	-	-	-	77,35	1,23
C	37,90	2,37	44,37	2,04	-	-	77,12	1,24
D	37,80	2,38	-	-	-	-	77,12	1,24
E	38,01	2,37	-	-	-	-	-	-
F	38,07	2,36	-	-	64,54	1,44	77,60	1,23

No espectro DRX citado podemos identificar quatro picos em torno de  $38,01^\circ$ ;  $44,37^\circ$ ;  $64,54^\circ$  e  $77,35^\circ$  atribuídos aos planos cristalográficos FCC (cúbico de face centrada) da prata metálica ( $\text{Ag}^0$ ), cujos valores de índice de Miller (hkl) relativos a esses planos são (111), (200), (220) e (311), respectivamente (SHAMELI *et al.*, 2012; VIVEKANANDHAN *et al.*, 2012; MEHTA *et al.* 2017; ALAHMADI *et al.*, 2018; VOLOVA *et al.*, 2018).

Os resultados de DRX confirmam a inserção das Np-Ag na matriz de celulose através da técnica de biossíntese, utilizando extrato de gerânio. Os picos relativos à prata metálica foram observados, especialmente, nas amostras dos biocompósitos, enquanto que na membrana de celulose e no branco da prata (onde não houve adição de extrato), tais picos não foram evidenciados. Além disso, os picos referentes à prata iônica ( $\text{Ag}^+$ ) – tais como:  $27,9^\circ$ ;  $32,3^\circ$ ;  $46,3^\circ$ ;  $55^\circ$ ;  $57,6^\circ$ ;  $67,6^\circ$ ;  $74,6^\circ$ ;  $76,9^\circ$  e  $85,7^\circ$ , correspondentes aos planos (111), (200), (220), (311), (222), (400), (331), (420), (422), respectivamente (PICOLI *et al.*, 2016) - não foram observados no espectro DRX, sugerindo que o processo de lavagem foi eficiente em todas as amostras.

Comparando os resultados aqui apresentados com as imagens MEV/EDS (item 6.4.1), verifica-se que, apesar de ter sido notado a presença de traços de prata na superfície da amostra denominada “branco da prata”, tal fato não foi confirmado pelo espectro DRX. Nesse sentido, sendo as análises de DRX as mais indicadas para evidenciar a presença das Np-Ag nas amostras, conclui-se que nas condições de biossíntese realizadas neste estudo (temperatura ambiente e tempo de 24h), a matriz de celulose (sem a presença de extrato) não foi capaz de reduzir  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$ . Embora, sabemos pela literatura que em condições específicas e a temperaturas mais altas ( $80^\circ\text{C}$  e tempo de 24h), a fibras de celulose quando intumescidas podem atuar como um veículo para a síntese das Np-Ag (Li *et al.* (2015).

O tamanho médio das Np-Ag produzidas dentro da membrana de celulose foi estimado a partir do espectro DRX, usando a equação 13, como mostrado no item 5.3.5. Os valores do

tamanho das Np-Ag estão resumidos na Tabela 19. Era esperado que o tamanho das Np-Ag aumentasse, à medida em que se utilizou maiores concentrações de  $\text{AgNO}_3$ , porém, durante a biossíntese *in situ* tal comportamento não foi observado.

Tabela 19: Tamanho das Np-Ag presentes nos biocompósitos FC/Np-Ag, intumescidos em 0,001 (B), 0,002 (C), 0,003 (D), 0,004 (E) e 0,005 (F) mol/L de  $\text{AgNO}_3$ .

Amostra	1 0 1		(nm)
	$\theta$	$\beta$ (rad)	
B	19,01	0,0076	20,17
C	18,95	0,0086	17,90
D	18,90	0,0124	12,36
E	19,01	0,0113	13,50
F	19,03	0,0109	14,04

De modo geral, conclui-se com este estudo que a biossíntese das Np-Ag na matriz de celulose, a partir do extrato de folhas de gerânio, foi realizada com êxito e que o tamanho das Np-Ag corresponde ao encontrado na literatura para esta via de síntese de Np-Ag (VIVEKANANDHAN *et al.*, 2012; MEHTA *et al.* 2017).

## 6.5 Estudo da liberação das Np-Ag

### 6.5.1 Liberação das Np-Ag *in vitro*

A partir da identificação dos picos característicos da banda de ressonância de plasmon de superfície (RPS) para as Np-Ag no item 6.3.2, foi possível estudar a liberação do complexo FC/Np-Ag no meio reacional.

Inicialmente, de acordo com os dados obtidos em UV-Vis (apêndices D, E e F), verificou-se que as Np-Ag obtidas da biossíntese *in situ* (matriz de celulose) foram liberadas apenas no comprimento de onda em 370 nm. Este fato pode ser justificado pela maior estabilização das Np-Ag quando sintetizadas diretamente no biocompósito FC/Np-Ag, permitindo assim a obtenção de nanopartículas de menor tamanho e, portanto, com menores comprimento de onda (SANTOS *et al.*, 2016).

Embora o foco deste trabalho foi estudar apenas as Np-Ag produzidas dentro da membrana de celulose (*in situ*), vale ressaltar que durante a biossíntese, também são sintetizadas

Np-Ag no meio reacional. Conforme reportado por Sivaranjana *et al.* (2017), Np-Ag geradas dentro dos filmes de celulose, utilizando extrato de folhas de *C. alata* como agente redutor, apresentaram tamanhos menores (em torno de 50-59 nm), quando comparadas às Np-Ag sintetizadas fora dos filmes, ou seja, em solução (faixa de 70-79 nm). O mesmo foi observado anteriormente por Sadanand *et al.* (2016), utilizando extrato de folhas de *Ocimum sanctum* para a biossíntese das Np-Ag. Os autores verificaram que as Np-Ag sintetizadas dentro e fora dos filmes de celulose, apresentaram diâmetros na faixa de 70-100 nm e 91-100 nm, respectivamente.

Para determinar a concentração de Np-Ag liberadas do biocompósito FC/Np-Ag em função do tempo e nas temperaturas de 23, 30 e 37°C, construiu-se uma curva de calibração (Figura 33). Nesta curva, utilizou-se soluções com concentrações conhecidas, preparadas a partir de uma solução mãe, contendo extrato de gerânio e AgNO<sub>3</sub> 3mM (1:1), de modo que a resposta para a absorbância em 370 nm foi convertida ao seu valor correspondente de concentração (mg/mL).

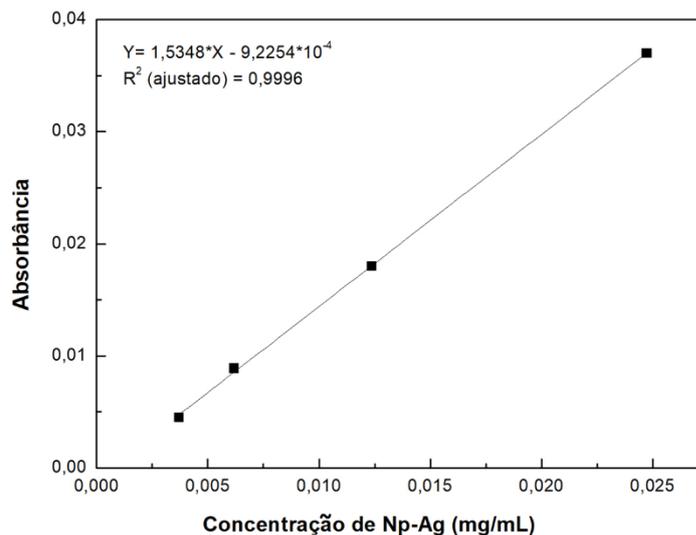


Figura 33: Curva de calibração linear do complexo FC/Np-Ag em meio contendo extrato de gerânio e AgNO<sub>3</sub> 3mM (1:1).

Observando o coeficiente de correlação da curva de calibração ( $R^2 = 0,9996$ ), nota-se que o ajuste linear foi bastante satisfatório. Além disso, através da equação da reta gerada pela linearização, pôde-se obter os dados apresentados na Figura 34.

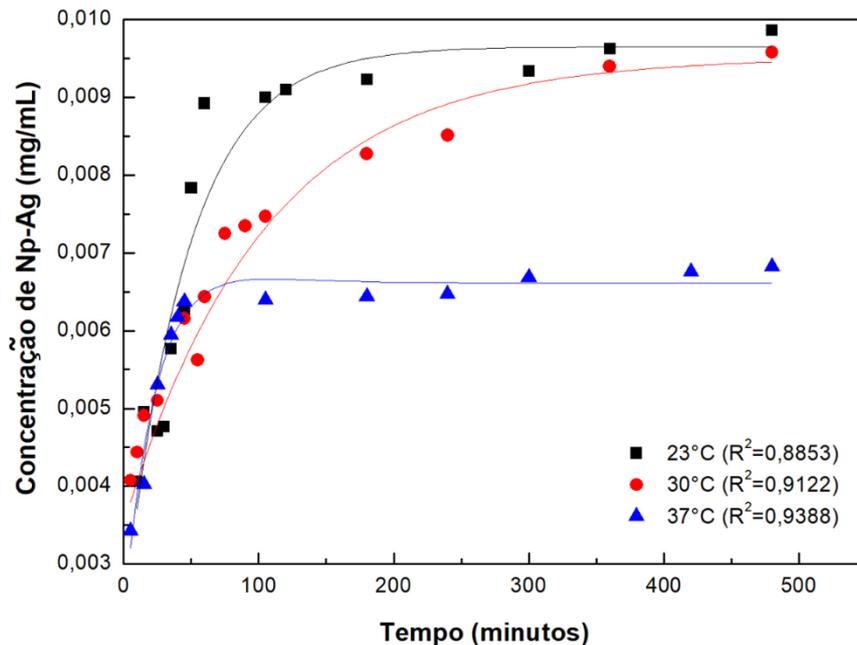


Figura 34: Perfil de liberação das Np-Ag a partir do biocompósito FC/Np-Ag, nas temperaturas de 23, 30 e 37°C.

Os valores aproximados dos coeficientes de correlação na Figura 34 ( $R^2 \sim 0,9000$ ) demonstram um ajuste exponencial satisfatório para as três temperaturas estudadas. As equações que deram origem aos gráficos da Figura 34, encontram-se no apêndice G. De acordo com a literatura, os três perfis de liberação das Np-Ag presentes no biocompósito apresentaram um modelo de liberação bimodal, ou seja, com duas fases distintas. Nesse sentido, observa-se que a primeira fase (até 100 minutos) é caracterizada pela liberação acelerada das nanopartículas, enquanto que a segunda fase consiste em uma liberação mais lenta, com consequente estabilização à medida que o tempo avança.

Na Figura 34 também é possível verificar que, quanto menor a temperatura, maior foram as concentrações de Np-Ag liberadas ao atingir-se o equilíbrio. Logo, em 23°C o equilíbrio foi atingido em torno de 100 minutos, liberando 0,0095 mg/mL de Np-Ag. Para 30°C, verificou-se concentração semelhante de liberação no equilíbrio (0,009 mg/mL), porém o tempo utilizado foi um pouco maior, cerca de 300 minutos. Finalmente, em 37°C, o equilíbrio ocorreu em aproximadamente 100 minutos de reação, liberando cerca de 0,0065 mg/mL de Np-Ag.

Tais observações estão de acordo com os dados apresentados no estudo do intumescimento da membrana de celulose (item 5.2.3), em que houve aumento da hidrofiliabilidade do material com a diminuição da temperatura. Ou seja, se a membrana apresenta maior capacidade de inchaço em menores temperaturas, é possível inferir que nas mesmas condições, ao utilizar o biocompósito (FC/Np-Ag), à medida em que o material retém mais água, haverá maior liberação de Np-Ag, como sugeriram os dados no perfil de liberação das nanopartículas.

Conforme Damm e Müstedt (2008), as propriedades de absorção de água dos nanocompósitos de poliamida/prata determinaram a liberação das Np-Ag. Nesse sentido, verificou-se que a hidrofiliabilidade do material favoreceu a liberação das nanopartículas, já que a liberação prolongada de íons prata aumentou exponencialmente para as amostras que apresentaram máxima absorção de água. Além disso, observou-se que as propriedades hidrofílicas dos polímeros governam a cinética da liberação. No estudo em questão, os polímeros que mais liberaram Np-Ag seguiram um mecanismo cinético de ordem zero. Para os autores, além da maior capacidade de inchaço, fatores como ausência de ligações cruzadas e diminuição da cristalinidade no polímero tendem a favorecer a liberação das Np-Ag.

## 6.5.2 Cinética da liberação das Np-Ag

A cinética de liberação das Np-Ag foi estudada avaliando o ajuste dos dados experimentais a um modelo cinético de ordem zero (item 5.3.6.3). Por regressão linear, determinou-se o coeficiente angular da reta, que se trata da constante de velocidade ( $k$ ) às temperaturas estudadas (23, 30 e 37°C) (Figura 35).

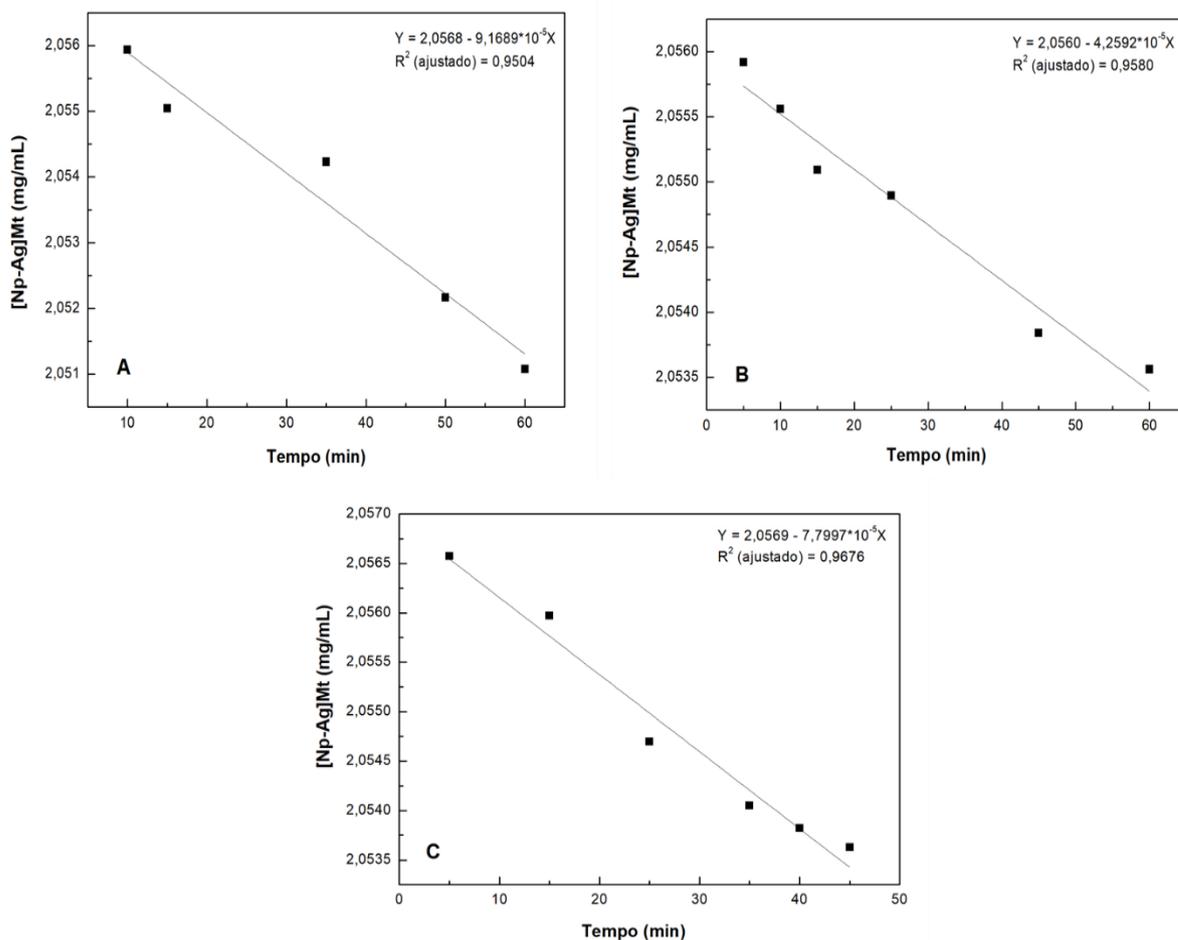


Figura 35: Regressão linear do ajuste cinético de ordem zero, para os dados de concentração de Np-Ag liberadas em função do tempo, nas temperaturas de 23°C (A), 30°C (B) e 37°C (C).

As constantes de velocidade  $k$  e os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) obtidos após cada linearização estão esquematizados na Tabela 20.

Tabela 20: Constantes de velocidade (k) e coeficientes de correlação ( $R^2$ ), obtidos após regressão linear do ajuste cinético de ordem zero, realizado no estudo da liberação das Np-Ag em função do tempo e nas temperaturas de 23, 30 e 37°C.

Temperatura (°C)	$k \cdot 10^{-5}$ (mg/mL*min)	$R^2$
23	9,1689	0,9504
30	4,2592	0,9580
37	7,7997	0,9676

As constantes de velocidade k obtidas para as três temperaturas confirmam o perfil de liberação das Np-Ag apresentado na Figura 34, em que maiores valores de k ocorreram nas temperaturas em que o equilíbrio foi atingido mais rapidamente, em torno de 100 minutos para 23 e 37°C.

Avaliando os valores dos coeficientes de correlação para as três temperaturas estudadas, é possível notar que os dados se adequaram satisfatoriamente ao modelo cinético escolhido ( $R^2 > 0,9$ ). Nesse sentido, pode-se inferir que a liberação das Np-Ag presentes no biocompósito FC/Np-Ag segue um perfil cinético de ordem zero. Na literatura, sabe-se que reações de ordem zero, são àquelas cujas velocidades são constantes, independente da concentração de reagente. Neste caso, segundo as equações demonstradas no item 5.3.6.3 e verificando os gráficos da Figura 34, nota-se que a concentração das Np-Ag diminui linearmente com o passar do tempo, à medida que são liberadas para o meio.

Em trabalho reportado por Salem e colaboradores (2011), estudou-se a cinética da liberação das Np-Ag sintetizadas através de processo químico. As nanopartículas geradas apresentaram diâmetro entre 5-20 nm e o perfil cinético de liberação seguiu o modelo de ordem zero, com  $R^2 > 0,96$ . Através das taxas de dissolução, os autores observaram que a liberação das nanopartículas está correlacionada ao seu tamanho, já que os dados apresentados demonstraram que quanto menor o tamanho das Np-Ag, mais rápida acontece a sua liberação. Tais resultados - associados à boa atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. coccus*, *Salmonellae* e *P. aeruginosa* e baixa citotoxicidade em menores concentrações - sugeriram aos autores que as Np-Ag podem ser usadas em produtos farmacêuticos devido, principalmente, à sua facilidade em difundirem-se através do local infectado.

### 6.5.2 Termodinâmica da liberação das Np-Ag

O estudo da liberação das Np-Ag *in vitro* em diferentes temperaturas permitiu a determinação da energia de ativação da liberação ( $E_L$ ). Tal parâmetro relaciona-se à energia necessária para mover as Np-Ag presentes na matriz de celulose para o meio reacional. Maiores valores de  $E_L$  indicam que grande quantidade de energia deve ser despendida para que as Np-Ag sejam liberadas ao meio, de modo que o processo se torna mais lento, quando comparado a sistemas que possuem uma barreira energética menor – ou seja, menores valores de  $E_L$ .

Utilizando a equação 20, conforme comportamento de Arrhenius, verificou-se que a  $E_L$  do processo de liberação, entre as temperaturas de 30 e 37°C, foi de 67,50 kJ/mol. Este alto valor de  $E_L$  corrobora com os resultados apresentados no estudo do intumescimento da membrana (item 6.2.3) e perfil de liberação (item 6.5.1). Nesse sentido, diante das condições estudadas, pôde-se inferir que o aumento da temperatura, tende a diminuir o grau de inchaço do material, resultando em menores níveis de liberação de Np-Ag para o meio. Portanto, tal comportamento justifica uma maior quantidade de energia ( $E_L$ ) a ser gasta para que o processo ocorra.

Outros parâmetros termodinâmicos também foram calculados, utilizando o intervalo entre 30 e 37°C, conforme procedimento descrito no item 5.3.6.4 e estão resumidos na Tabela 21. Tais parâmetros são importantes pois caracterizam termodinamicamente o comportamento do biocompósito FC/Np-Ag, durante a liberação das Np-Ag, nas condições estudadas.

Tabela 21: Parâmetros termodinâmicos da liberação das Np-Ag presentes no biocompósito FC/Np-Ag

Temperatura (°C)	$\Delta G^\#$ (kJ/mol)	$\Delta H^\#$ (kJ/mol)	$\Delta S^\#$ (kJ/mol*K)
30	99,60		
37	100,40	64,95	-0,1143

Diante dos dados apresentados, observou-se que a entalpia do processo de liberação das Np-Ag foi positiva durante o estado de transição ( $\Delta H^\# > 0$ ), caracterizando um sistema de natureza endotérmico. Portanto, nas condições estudadas, as interações moleculares entre o bicompósito FC/Np-Ag e as Np-Ag são fortes, o que se justifica pelo alto valor de  $E_L$  encontrado. A entropia obtida para o estado de transição foi negativa ( $\Delta S^\# < 0$ ), o que demonstra

uma diminuição da desordem do sistema (FREIRE *et al.*, 2017). De acordo com a literatura (VASILIU *et al.*, 2011), a entropia do sistema diminui pois, verifica-se uma tendência ao equilíbrio entre a quantidade de Np-Ag presentes dentro da matriz de celulose e fora dela, durante o processo de liberação.

A energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) está relacionada com a quantidade de energia disponível para que as reações ocorram, onde valores negativos implicam em um processo espontâneo, a temperatura e pressão constantes (FERRERO *et al.*, 2010). Neste trabalho, obteve-se valores positivos de energia livre de Gibbs para o complexo ativado ( $\Delta G^\ddagger > 0$ ), demonstrando que o sistema não é naturalmente espontâneo nas temperaturas estudadas. Em outros trabalhos de estudo de liberação de fármacos foi observado que o sistema não foi espontâneo, ou seja, os valores de energia de livre de Gibbs foram positivos (FREIRE *et al.*, 2017).

## 6.6 Ensaios microbiológicos

A eficácia da atividade antimicrobiana das Np-Ag está diretamente relacionada à liberação de íons prata nas células, uma vez que sua presença na parede celular dos microrganismos induz a interação com proteínas, que inibem funções do DNA e provocam danos na cadeia respiratória (WONG, *et al.*, 2010; CAVALCANTE, 2014).

A Figura 36 ilustra os ensaios microbiológicos realizados conforme metodologia descrita no item 5.3.7, enquanto as médias dos halos de inibição do crescimento bacteriano estão comparadas na Figura 37. Os valores dos diâmetros de inibição e seus respectivos desvios padrão encontram-se no apêndice H.

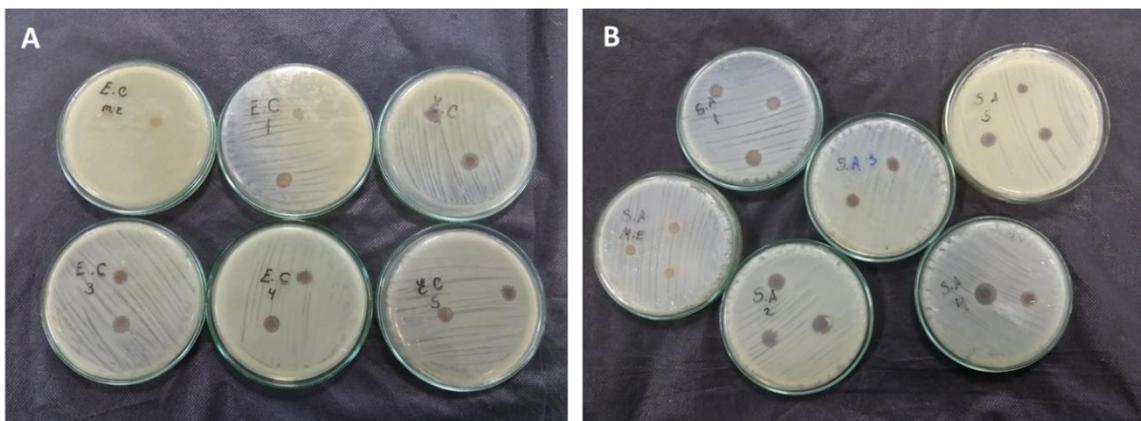


Figura 36: halos de inibição do crescimento bacteriano para *Escherichia coli* (A) e *Staphylococcus aureus* (B) na membrana intumescida no extrato e nos biocompósitos FC/Np-Ag (1, 2, 3, 4 e 5 mM de  $\text{AgNO}_3$ ).

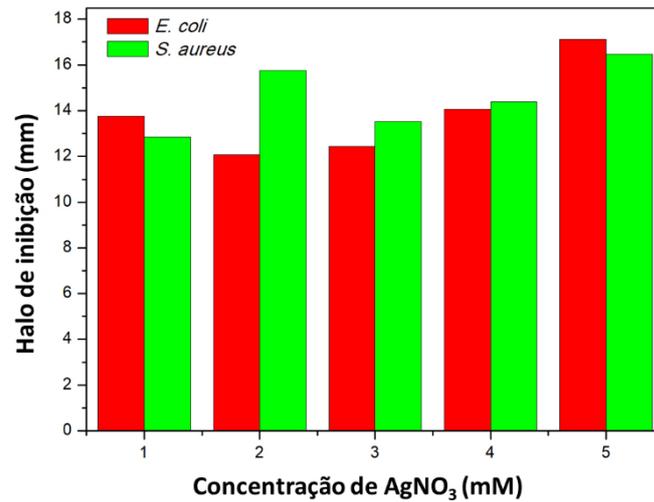


Figura 37: Comparação entre as médias dos halos de inibição do crescimento bacteriano obtidos após teste de sensibilidade bacteriana às Np-Ag.

Conforme Figura 37 é possível notar que a atividade antimicrobiana das Np-Ag foi eficaz tanto para a bactéria *Escherichia coli* quanto para *Staphylococcus aureus* (faixa de 12-17 mm), apresentando zonas de inibição semelhantes, quando se comparou concentrações de  $\text{AgNO}_3$  iguais. Tratando-se da concentração de 2 mM de  $\text{AgNO}_3$ , observou-se halos de inibição mais diferenciados, com valores aproximados de 12 e 16 mm para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Tais resultados podem estar associados à capacidade de difusão do antimicrobiano no meio ágar, afetando assim o tamanho dos halos (MONTANARI *et al.*, 2012).

De modo geral, aumentando a concentração de solução de  $\text{AgNO}_3$  nos biocompósitos FC/Np-Ag, maior foram os halos de inibição obtidos e, conseqüentemente, melhores foram as atividades antimicrobianas. Além da concentração de prata, fatores como tamanho das nanopartículas e nível de aglomeração entre elas também podem interferir no efeito contra os microrganismos. A literatura mostra que quanto menor a nanopartícula, maior é a sua capacidade de infiltração nas células, reduzindo a permeabilidade da membrana e prejudicando a síntese de proteínas essenciais ao metabolismo celular (SANA & DOGIPARTHI, 2018). Logo, comparando os resultados aqui obtidos com os da Tabela 19, verificou-se que os maiores halos de inibição ocorreram para as amostras que, além de apresentarem as maiores concentrações de Np-Ag (> 3 mM), também obtiveram os menores diâmetros de nanopartículas.

Através da síntese verde, utilizando suco de frutas (lima, limão doce e laranja) e solução de  $\text{AgNO}_3$  (1 e 10 mM), Hungund e colaboradores (2015) estudaram a atividade antimicrobiana

das Np-Ag, comparando as medidas dos halos de inibição para as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumonia* e *Staphylococcus aureus*. O estudo mostrou que as Np-Ag sintetizadas a partir do suco de laranja foram mais efetivas na inibição do crescimento bacteriano. Nestas condições, observou-se que *S. aureus* (Gram-positiva) foi mais resistente às Np-Ag, apresentando zona de inibição de 5 mm, enquanto que as outras bactérias (Gram-negativas) obtiveram diâmetros maiores, entre 8 e 6 mm. Os autores apontam que diferenças morfológicas na parede celular das cepas podem ter influenciado nos resultados, já que bactérias Gram-positivas possuem uma camada mais espessa de peptidoglicano.

De acordo com Soo-Hwan *et al.* (2011), a principal função da camada de peptidoglicano é proteger a célula contra agentes antimicrobianos, como antibióticos, toxinas e elementos químicos. Além da espessura da camada de peptidoglicano, a presença ou ausência de membrana externa também atua como fator diferencial na estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Figura 38).

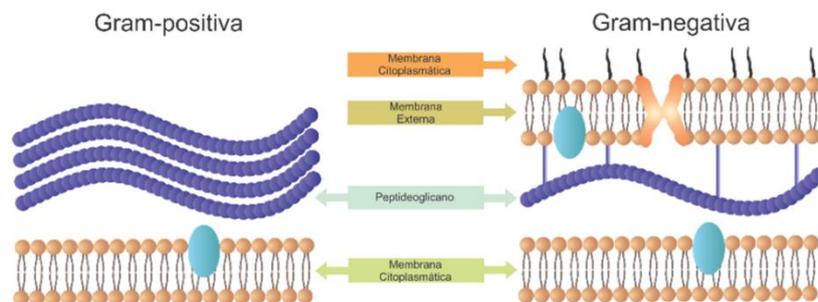


Figura 38: composição morfológica da parede celular das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa (Adaptado de C&EM, 2015).

Para a membrana apenas intumescida no extrato de gerânio (amostra usada como controle), não foi observada atividade antimicrobiana em ambas as bactérias estudadas, sendo o mesmo verificado por Pandian *et al.* (2013). Neste trabalho, Np-Ag sintetizadas a partir da mistura de 10 mL de extrato de folhas de gerânio com 90 mL de solução 5 mM de  $\text{AgNO}_3$  apresentaram boa atividade antimicrobiana contra as bactérias *K. pneumonia* (2.7 cm), *S. someneii* (2.4 cm), *S. flexaneri* (2.4 cm), *P. aeruginosa* (2.2 cm), *P. mirabilis* (2.1 cm) e *E. coli* (2.0 cm). Portanto, diante do bom desempenho das Np-Ag em inibir o crescimento bacteriano, os autores sugerem que este material possui alta aplicação em indústrias alimentícias, cosméticas e biomédicas.

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, foi possível concluir que:

- O pré-tratamento com hidróxido de sódio (NaOH) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi capaz de extrair e purificar a celulose, removendo os outros principais componentes da casca da batata: amido, hemicelulose e lignina. Através do estudo do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> na etapa de polpação alcalina, observou-se que os efeitos da concentração e da temperatura influenciaram na variação do rendimento, enquanto que na formação do filme (membrana), apenas o efeito da temperatura foi significativo.
- Nos ensaios em que se obteve filme ao final do processo de branqueamento (15% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 60°C, por 6h), o maior rendimento foi de 1,650% (± 0,047), utilizando 0,5 mol/L de NaOH a 80°C, por 2,5h. Logo, o material obtido a partir deste ensaio foi o escolhido para os demais experimentos de caracterização e síntese do biocompósito FC/Np-Ag.
- A eficácia do tratamento utilizando NaOH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi comprovada através da caracterização da membrana. Análises por espectroscopia FTIR indicaram a presença de celulose na membrana e revelaram ausência de bandas características às principais ligações da hemicelulose e da lignina. Análises DRX da membrana confirmaram que a celulose extraída da casca da batata apresenta padrão cristalino semelhante à celulose do tipo I e II e o índice de cristalinidade foi 73,42%. As imagens MEV obtidas também corroboraram com os demais resultados de caracterização da membrana.
- Pela análise do comportamento térmico da membrana, verificou-se que cerca de 80% da celulose foi degradada a altas temperaturas (340°C e 442°C). A energia de ativação da degradação térmica da membrana foi de aproximadamente 164 kJ/mol, indicando que a celulose extraída da casca da batata é um material com elevada estabilidade térmica.
- O estudo do intumescimento revelou que, devido à alta capacidade de hidratação da membrana, associada à insolubilidade da celulose em água, o material apresentou comportamento de um hidrogel. Também foi observado que a temperatura teve influência no processo, já que a temperatura de transição de fase da celulose ocorreu próxima de 40°C. Esta temperatura pode ser classificada como LCST, pois abaixo dela, o polímero apresentou conformação estendida (aumentando o teor de intumescimento), enquanto que acima, o polímero colapsou (diminuindo o teor de intumescimento).

- Pelas análises de caracterização do extrato de gerânio através dos espectros de UV-visível e FTIR, verificou-se a presença de grupos químicos funcionais, como carbonilas e hidroxilas, capazes de reduzirem e estabilizarem os íons prata ( $\text{Ag}^+$ ) a Np-Ag.
- O crescimento das Np-Ag em meio aquoso foi verificado através de mudanças da coloração da solução de amarelo claro para marrom, sendo confirmado pelas análises por UV-visível. Tais análises indicaram a presença de bandas de absorção em 370 e 470 nm, que são bandas típicas da região de ressonância de plasmon de superfície (RPS) para as Np-Ag. Além disso, o pico referente à prata iônica (298 nm) não foi observado no espectro.
- Os biocompósitos FC/Np-AG foram caracterizados por MEV quanto à sua morfologia. À medida em que se aumentou a concentração da solução de  $\text{AgNO}_3$ , verificou-se que a coloração dos biocompósitos passou de amarelo claro para marrom, indicando tanto a redução de  $\text{Ag}^+$  a Np-Ag, quanto o aumento de seu conteúdo nas membranas de celulose.
- A presença das Np-Ag nos biocompósitos foi confirmada por análises DRX e o tamanho médio das Np-Ag produzidas variou entre 20-12 nm. Os difratogramas também mostraram que o perfil cristalino da celulose no biocompósito não foi modificado, embora tenha-se observado uma diminuição da cristalinidade nas amostras intumescidas em solução contendo  $\text{Ag}^+$ .
- A atividade antimicrobiana das Np-Ag foi eficaz tanto para a bactéria *Escherichia coli* quanto para *Staphylococcus aureus*, apresentando halos de inibição na faixa de 12-17 mm. De modo geral, verificou-se que os maiores halos de inibição ocorreram para os biocompósitos que, além de apresentarem as maiores concentrações de Np-Ag ( $> 3 \text{ mM}$ ), também obtiveram os menores diâmetros de nanopartículas.
- O estudo da liberação revelou que as Np-Ag obtidas da biossíntese *in situ* (matriz de celulose) foram liberadas apenas no comprimento de onda em 370 nm, sugerindo maior estabilização das nanopartículas quando sintetizadas diretamente no biocompósito. Os perfis de liberação (concentração x tempo) para as temperaturas de 23, 30 e 37°C apresentaram ajuste exponencial satisfatório ( $R^2 \sim 0,9000$ ), seguindo um modelo bimodal.
- O equilíbrio foi atingido mais rapidamente na temperatura de 23°C, liberando 0,0095 mg/mL de Np-Ag. Em 30°C, verificou-se concentração semelhante de liberação no equilíbrio (0,009 mg/mL), porém o tempo utilizado foi um pouco maior, cerca de 300 minutos. Em 37°C, o equilíbrio ocorreu em aproximadamente 100 minutos de reação, liberando cerca de 0,0065 mg/mL de Np-Ag. Nesse sentido, pôde-se inferir que a diminuição da temperatura resultou em maior liberação das Np-Ag.

- A liberação das Np-Ag presentes no biocompósito FC/Np-Ag para as três temperaturas estudadas seguiu um perfil cinético de ordem zero ( $R^2 > 0,9$ ). A energia de ativação da liberação ( $E_L$ ) entre as temperaturas de 30 e 37°C foi de 67,50 kJ/mol. No mesmo intervalo de temperatura, outros parâmetros termodinâmicos do complexo ativado, como entalpia ( $\Delta H^\#$ ), entropia ( $\Delta S^\#$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\#$ ), revelaram um processo de natureza endotérmico, com tendência a diminuição da desordem do sistema e naturalmente não espontâneo.
- Portanto, a partir da utilização de um resíduo agroindustrial de baixo custo, este trabalho contribuiu para a síntese e caracterização do biocompósito FC/Np-Ag, que devido às suas características físico-químicas e antimicrobianas, apresenta grande potencial para atuar no tratamento de feridas. Estudos posteriores deverão ser feitos para comprovar a eficácia clínica do biomaterial, a partir de testes de citotoxicidade e genotoxicidade, utilizando células humanas e animais.

## 8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

FRIEND, D. F. L.; GONZALEZ, M. E. L.; CARABALLO, M. M.; QUEIROZ, A. A. A. Biological properties of electrospun cellulose scaffolds from biomass. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 30, p. 1-16, 2019. (DOI: [10.1080/09205063.2019.1636351](https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1636351))

## REFERÊNCIAS

ABBA – Associação Brasileira da Batata. **Botânica – Morfologia da Batata**. Disponível em: <<http://www.abbabatatabrasileira.com.br/site/botanica/>>, acesso em: 10 de maio, 2016<sup>a</sup>.

ABBA – Associação Brasileira da Batata. **Batata - Produção Brasileira**. Disponível em: <[http://www.abbabatatabrasileira.com.br/images/pdf/batatabrasil\\_app.pdf](http://www.abbabatatabrasileira.com.br/images/pdf/batatabrasil_app.pdf)>, acesso em: 11 de Maio, 2016<sup>b</sup>.

ABBOUD, E. C.; LEGARE, T. B.; SETTLE, J. C.; BOUBEKRI, A. M.; BARILLO, D. J.; MARCET, J. E.; SANCHEZ, J. E. Do silver-based wound dressings reduce pain? A prospective study and review of the literature. **Burns**, p. 40-47, 2014.

ABRAHAM, G. A.; QUEIROZ, A. A. A.; ROMÁN, J. S. Hydrophilic hybrid IPNs of segmented polyurethanes and copolymers of vinylpyrrolidone for applications in medicine. **Biomaterials**, v. 22, p. 1971-1985, 2001.

AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 675-685, 2011.

AHAMED, M. I. N.; SANKAR, S.; KASHIF, P. M.; BASHA, S. K. H.; SASTRY, T. P. Evaluation of biomaterial containing regenerated cellulose and chitosan incorporated with silver nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 680–686, 2015.

AKHTAR, B. S. et al. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. **ACS sustainable Chemistry and Engineering**. v. 1, p. 591-602, 2013.

ALÉN, R. Structure and chemical composition of wood. In STENIUS, P. (Editor). **Forest Products Chemistry**. Finlândia: Gummerus Printing, p. 12, 2000.

ALAHMADI, N. S.; BETTS, J. W.; HEINZE, T.; KELLY, S. M.; KOSCHELLA, A.; WADHAWAN, J. D. Synthesis and antimicrobial effects of highly dispersed, cellulose-stabilized silver/cellulose nanocomposites. **Royal Society of Chemistry Advance**, v. 8, p. 3646–3656, 2018.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851–4861, 2010.

ANGELOVA, T.; RANGELOVA, N.; UZUNOVA, V.; GEORGIEVA, N.; ANDREEVA, T.; MOMCHILOVA, A.; TZONEVA, R.; MÜLLER, R. Cytotoxicity and antibiofilm activity of SiO<sub>2</sub>/cellulose derivative hybrid materials containing silver nanoparticles. **Turk Journal of Biology**, v. 40 p. 1278-1288, 2016.

ARAPOGLOU, D.; VARZAKAS, T. H.; VLYSSIDES, A.; ISRAILIDES, C. Ethanol production from potato peel waste. **Waste Management**, v. 30, p. 1898-1902, 2010.

ARUNKUMAR, R. P. A Review on Hemostatic Wound Dressings. **Ijariie**, v. 3, p. 3908-3913, 2017.

ASTM - American Society for Testing and Materials. **Norma E 1641-04** - Standard Test Method for Decomposition Kinetics by Thermogravimetry. Estados Unidos da América, novembro de 2004.

ATSUSHI, K.; AZUMA, J-i.; TETSUO, K. Lignin-Carbohydrate Complexes and Phenolic Acids in Bagasse. **Holzforschung**, v. 38, p. 141-149, 1984.

BARUD, H. S; REGIANI, T.; MARQUES, R. F. C; LUSTRI, W R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Antimicrobial Bacterial Cellulose-Silver Nanoparticles Composite Membranes. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

BESSA, L. J.; FAZZI, P.; GIULIO, M. D.; CELLINI, L. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. **International Wound Journal**, 2013. doi: 10.1111/iwj.12049

BIANCHI, M. L. **Branqueamento de Polpas Kraft com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e reação de oxidação de composto modelo de lignina catalisadas por polioxometalatos**. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas/SP, 1999.

BISMARCK, A.; MISHRA, S.; LAMPKE, T. Natural fibres, biopolymers and Biocomposites. In: A. K. MOHANTY, M.; MISRA, M.; DRZAL, L. T. (Editores). **Cellulose Fibers: Bio- and Nano-Polymer Composites**. CRC Press., p. 37, 2005.

BRAGG, W. L., The Diffraction of short electromagnetic waves by a crystal. Proc. **Cambridge Philos**, v. 17, p. 43–57, 1913.

BRINCHIA, L.; COTANAA, F.; FORTUNATIB, E.; KENNYB, J. M. Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: Technology and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94 p. 154– 169, 2013.

CABALA, G. V. E. **Desenvolvimento de filtros cerâmicos impregnados com nanopartículas de prata para desinfecção de água para consumo humano contaminada com bactéria fecal**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2013.

CAMIRE, M. E.; VIOLETTE, D.; DOUGHERTY, M. P.; MCLAUGHLIN, M. A. Potato peel dietary fiber composition: effects of peeling and extrusion cooking processes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1404-1408, 1997.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas - **Wound healing**. **Arq. Bras. Cir. Dig (ABCD)**, v. 20, n. 7, p. 51-8, 2007.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, n. 8, v. 32, 2191-2195, 2009.

CASTELLANO, J. J. SHAFII, S. M.; KO, F. DONATE, G.; WRIGHT, T. E.; MANNARI, R. J.; PAYNE, W. G.; SMITH, D. J.; ROBSON, M. C. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. **International Wound Journal**, v. 4, n° 2, p. 114-122, 2007.

CAVALCANTE, N. B. **Atividade antibacteriana e antifúngica de nanopartículas de prata produzidas por *Curvularia inaequalis* (Shear) Boedijn**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina/PE, 2014.

CAVALCANTI, O.A.; VAN DER MOOTER, G.; CARAMICO-SOARES, I.; KINGET, R. Polysaccharides as excipients for colon-specific coatings, permeability and swelling properties of casted films. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 28, n. 2, p. 157-164, 2002.

C&EN – **Chemical & Engineering News**. Disponível em: <<https://cen.acs.org/articles/93/web/2015/04/New-Spin-Old-Gram-Stain.html>>, acesso em 22 de agosto, 2018.

CHANG, C.; ZHANG, L. Cellulose-based hydrogels: Present status and application prospects. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 40–53, 2011.

CHANG, W. S.; CHEN, H. H. Physical properties of bacterial cellulose composites for wound dressings. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 75-83, 2016.

CHEMISTRY GLOSSARY – **Starch**. Disponível em: <<http://glossary.periodni.com/glossary.php?en=starch>>, acesso em 14 de Maio, 2017.

CHEN, D. **Biocomposites Reinforced with Cellulose Nanocrystals Derived from Potato Peel Waste**. Dissertação (Mestrado). McMaster University, Hamilton, Ontario, 2011.

CHEN, D; LAWTON, D; THOMPSON, M. R.; LIU, Q. Biocomposites reinforced with cellulose nanocrystals derived from potato peel waste. **Carbohydrate Polymers**, 90 p. 709–716, 2012.

CHEN, Y.; STEVENS, M. A.; ZHU, Y.; HOMES, J.; XU, H. Understanding of alkaline pretreatment for corn stover enzymatic saccharification. **Biotechnology for Biofuels**, 6:8, 2013.

CHINGA-CARRASCO, G.; SYVERUD, K.; Pretreatment-dependent surface chemistry of wood nanocellulose for pH-sensitive hydrogels. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 29, p. 423-432, 2014.

CIACCO, C. F.; CRUZ, R. **Fabricação de amido e sua utilização**. São Paulo, Secretária da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia. (Série Tecnologia Agroindustrial, 07), 152 p., 1982.

COUTINHO, A. P. C. **Produção e caracterização de maltodextrinas a partir de amidos de mandioca e batata-doce**. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho(UNESP), Botucatu/SP, 2007.

CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN JR., R. M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Bio Macromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2007.

DAMM, C.; MUNSTEDT, H. Kinetic aspects of the silver ion release from antimicrobial polyamide/silver nanocomposites. **Applied. Physics. A**, v. 91, p. 479–486, 2008.

DUFRESNE, A.; DUPEYRE, D.; VIGNON, M. R. Cellulose microfibrils from potato tuber cells: Processing and characterization of starch–cellulose microfibril composites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 76, 2080–2092, 2000.

DURAN, N.; MARCARTO, P. D.; DE SOUZA, G. I. H.; ALVES, O. L.; ESPOSITO, E. E. Antibacterial effect of silvernanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluenttreatment. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, p. 203–208, 2007.

DWIVEDI, A. D.; GOPAL, K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. **Colloides and Surfaces A**, v. 369, p. 27-33, 2010.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistics Division**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/FB/BC/E>>, acesso em 6 de Maio, 2016.

FELLER, R. L.; WILT, M. Evaluation of Cellulose Ethers for Conservation. **Research in Conservation**, v. 3. The Getty Conservation Institute, 1990.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure reactions**. New York: W. De Gruyter, 1989.

FERNANDES, P. E. **Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2014.

FERNANDÉZ, M. A. V. **Avaliação dos processos de polpação soda-antroquinona e bissulfito-base magnésio para bambu**. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba/SP, 2010.

FERRERO, C.; MASSUELLE, D.; DOELKER, E. Towards elucidation of the drug release mechanism from compressed hydrophilic matrices made of cellulose ethers. II. Evaluation of a possible swelling-controlled drug release mechanism using dimensionless analysis. **J. Control. Release**, v. 141, p. 223–233, 2010.

FORD, E. N. J., MENDON, S. K.; THAMES, S. F.; RAWLINS, J. W. X-ray diffraction of cotton treated with neutralized vegetable oil-based macromolecular crosslinkers. **Journal of Engineered Fibers and Fabric**, v.5, p. 10-20, 2010.

FRANCO-ROMANO, M.; GIL, M. L. A.; PALACIOS-SANTANDER, J. M.; DELGADO-JAÉN, J. J.; NARANJO-RODRÍGUEZ, I.; HIDALGO-HIDALGO DE CISNEROS, J. L.; CUBILLANA-AGUILERA, L. M. Sonosynthesis of gold nanoparticles from a geranium leaf extract. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, p. 1570–1577, 2014.

FREIRE, M. C. L. C.; ALEXANDRINO, F.; MARCELINO, H. R.; PICCIANI, P. R. S.; SILVA, K. G. H.; GENRE, J.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Understanding Drug Release Data through Thermodynamic Analysis. **Materials**, v. 10, I. 6, p.1-18, 2017.

FU, L.; ZHOU, P.; ZHANG, S.; YANG, G. Evaluation of bacterial nanocellulose-based uniform wound dressing for large areaskin transplantation. **Materials Science and Engineering**, v. C 33, p. 2995–3000, 2013.

FURLANETTO, M. C. S. **Desenvolvimento de filmes de carboximetilcelulose com nanopartículas de prata e avaliação de sua atividade antimicrobiana e toxicidade**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP, 2014.

GENOMICS – US Department of Energy’s Genomic. **Office of Biological and Environmental Research**. Disponível em: <<https://public.ornl.gov/site/gallery/default.cfm>>, acesso em 12 de Junho, 2016.

GURUNATHAN, T.; MOHANTY, S.; NAYAK, S. K.; A Review of the recent development in biocomposites based on natural fibres and their application perspectives. **Composites**, v. 77, p. 1-25, 2015.

GUSTAITE, S.; KAZLAUSKE, J.; BOBOKALONOV, J.; PERNI, S.; DUTSCHK, V.; LIESIENE, J.; PROKOPOVICH, P. Characterization of cellulose based sponges for wound dressings. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 480, p. 336–342, 2015.

HAN, L.; FENG, J.; ZHANG, S.; MA, Z.; WANG, Y.; ZHANG, X. Alkali pretreated of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 53-61, 2012.

HAKKARAINEN, T.; KOIVUNIEMI, R.; KOSONEN, M.; ESCOBEDO-LUCEA, C.; SANZ-GARCIA, A.; VUOLA, J.; VALTONEN, J.; TAMMELA, P.; MÄKITIE, A; LUUKKO, K.; YLIPERTTULA, M.; KAVOLA, H. Nanofibrillar cellulose wound dressing in skin graft donor site treatment. **Journal of Controlled Release**, v.244, p. 292–301, 2016.

HENRIKSSON, G.; LENNHOLM, H. Cellulose and Carbohydrate Chemistry. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. (Editores). **Pulp and Paper Chemistry and Technology: Wood Chemistry and Wood Biotechnology**. Göttingen, Alemanha: Hubert & Co. GmbH & Co. KG., v. 1, p. 71, 2009<sup>a</sup>.

HENRIKSSON, G. Lignin. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. (Editores). **Pulp and Paper Chemistry and Technology: Wood Chemistry and Wood Biotechnology**. Göttingen, Alemanha: Hubert & Co. GmbH & Co. KG., v. 1, p. 121., 2009<sup>b</sup>.

HIGA, F. G. R.; TAMBOURGI, E. B.; GIANNETTI, A. A. M. Aplicação do peróxido de hidrogênio como reforço da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar. **Exacta** São Paulo, v. 10, n. 2, p. 281-288, 2012.

HOENICH, N. Cellulose for medical applications: past, present and future. **BioResources**, v. 1, p. 270-280, 2006.

HUNGUND, B. S.; DHULAPPANAVAR, G. R.; AYACHIT, N. H. Comparative Evaluation of Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Biosynthesized Using Fruit Juices. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 6, I. 2, 2015.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal: culturas temporárias e permanentes**. Brasil, v. 39, 2012.

JAIN, S.; SANDHU, P. S.; MALVI, R.; GUPTA, B. Cellulose Derivatives as Thermoresponsive Polymer: An Overview. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 139-144, 2013.

JANU, K. U.; RAVEENDRAN, S.; BINOD, P.; KUTTIRAJA, M.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Studies on physicochemical changes during alkali pretreatment and optimization of hydrolysis conditions to improve sugar yield from bagasse. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 70, p. 952-958, 2011.

JOHN, M. J.; THOMAS, S. Biofibres and Biocomposites. **Carbohydrate polymers**, v. 71, p. 343-364, 2008.

JORFI, M. & FOSTER, E. J. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications. **Journal of Applied Polymer Science**, n. 41719, p. 1-19, 2015.

KISSINGER, H. E. Reactions kinetics in differential thermal analysis. **Analytical Chemistry**, v. 29 (11), p. 1702 – 1706, 1957.

KUMAR, A.; WANG, L.; DZENIS, Y. A.; JONES, D. D.; HANNA, M. A. Thermogravimetric characterization of corn stover as gasification and pyrolysis feedstock. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 460-467, 2008.

KUMAR, P.; BARRET, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 48, p. 3713–3729, 2009.

KUMAR, A.; NEGI, Y. S.; CHOUDHARY, V.; BHARDWAJ, N. K. Characterization of Cellulose Nanocrystals Produced by Acid-Hydrolysis from Sugarcane Bagasse as Agro-Waste. **Journal of Materials Physics and Chemistry**, v. 2, n° 1, 2014.

KWAK, M. H.; KIM, J. E.; GO, J.; KOH, E. K.; SONG, S. H.; SON, H. J.; KIM, H. S.; YUN, Y. H.; JUNG, Y. J.; HWANG, D. Y. Bacterial cellulose membrane produced by *Acetobacter* sp. A10 for burn wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v.122, p. 387–398, 2015.

LAILER, K. J.; KING, M. C. Development of transition-state theory. **J. Phys.Chem.** v. 87, p. 2657–2664, 1983.

LAKSHMI, D. S.; TRIVEDI, N. REDDY, C. R. K. Synthesis and characterization of seaweed cellulose derived carboxymethyl cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1604–1610, 2017.

LAURITO-FRIEND, D.F. **Pré-tratamento sulfite alcalino e hidrólise enzimática de bagaços de cana-de-açúcar com diferentes composições químicas**. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (USP), 2013.

LEAPER, D. J. Silver dressings: their role in wound management. **International Wound Journal**, v. 3, n°4, p. 282-294, 2006.

LEE, O. K. **Mechanistic studies of the oxidation of lignin and cellulose models**. Tese (Doutorado), University of Maine, 2002.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 839 p., 2000.

LI, R.; HE, M.; LI, T.; ZHANG, L. Preparation and properties of cellulose/silver nanocomposite fibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 269–275, 2015.

LI, Q.; MAHENDRA, S.; LYON, D. Y.; BRUNET, L.; LIGA, M. V.; LI, D.; ALVAREZ, P. J. J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. **Water Research**, v. 42, p. 4591-4602, 2008.

LI, R.; HE, M.; TONG, L.; ZHANG, L. Preparation and properties of cellulose/silver nanocomposite fibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 269-275, 2015.

LIANG, S.; MCDONALD, A. G. Chemical and Thermal Characterization of Potato Peel Waste and Its Fermentation Residue as Potential Resources for Biofuel and Bioproducts Production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 8421-8429, 2014.

LIMA, M. A.; GOMEZ, L. D.; STEELE-KING, C. G.; SIMISTER, R.; BERNARDINELLI, D. O.; CARVALHO, M. A.; REZENDE, C. A.; LABATE, C. A.; AZEVEDO, E. R.; MCQUEEN-MASON, S. J.; POLIKARPOV, I. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. **Biotechnology for Biofuels**, 7:10, 2014.

LUDUEÑA, L. N.; VECCHIO, A.; STEFANI, P. M.; ALVAREZ, V. A. Extraction of Cellulose Nanowhiskers from Natural Fibers and Agricultural Byproducts. **Fibers and Polymers**, v. 14, n. 7, p. 1118-1127, 2013.

MANEERUNG, T.; TOKURA, S.; RUJIRAVANIT, R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 43–51, 2008.

MADER, J.; RAWEL, H.; KROH, L. Composition of phenolic compounds and glycoalkaloids  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine during commercial potato processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6292-6297, 2009.

MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, p. 393-410, 2003.

MANEERUNG, T.; TOKURA, S.; RUJIRAVANIT, R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 43–51, 2008.

MATTOS, I. L.; SHIRAIISHI, K. A.; BRAZ, A. D.; FERNADES, J. R. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. **Química Nova**, v. 26, p. 373-380, 2003.

MEHTA, B. K.; CHHAJLANI, M.; SHRIVASTAVA, B. D. Green synthesis of silver nanoparticles and their characterization by XRD. **Journal of Physics: Conf. Series** 836, 2017.

MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 346-356, 2013.

MONIRI, M.; MOGHADDAM, A. B.; AZIZI, S.; RAHIM, R. A.; ZUHAINIS S. W.; NAVADERI, M.; MOHAMAD, R. In vitro molecular study of wound healing using biosynthesized bacteria nanocellulose/silver nanocomposite assisted by bioinformatics databases. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 5097–5112, 2018.

MONTANARI, R. M.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, C. J.; ANDRADE, N. J.; ISMAIL, M. D. F.; BARBOSA, M. C. A. Exposure to an acardiaceae volatile oils and their constituents induces lipid peroxidation within food-borne bacteria cells. **Molecules**, v. 17, 9728-9740, 2012.

MORAES, P. R. F. S.; SASKA, S.; BARUD, H.; LIMA, L. R. L.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G.; RIBEIROS, J. L. G. GASPAR, A. M. M. Bacterial Cellulose/Collagen Hydrogel for Wound Healing. **Materials Research**, v. 19, p. 106-116, 2016.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673–686, 2005.

MULVANEY, P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. **Langmuir**, v. 12, 788-800, 1996.

NAM, S.; FRENCH, A. D.; BRIAN, D. C.; SEGAL, M. C. Crystallinity Index revisited by the simulation of X-ray diffraction patterns of cotton cellulose I $\beta$  and cellulose II. **Carbohydrate Polymers**, v. 135, p. 1–9, 2016.

NORDLI, H. R.; CHINGA-CARRASCO, G.; ROKSTAD, A. M. PUKSTAD, B. Producing ultrapure wood cellulose nanofibrils and evaluating the cytotoxicity using human skin cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 65–73, 2016.

PÁEZ, X.; HERNÁNDEZ, L. Topical hemostatic effect of a common ornamental plant, the Geraniaceae *Pelargonium zonale*. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 43, p. 291-295, 2003.

PANDIAN, M.; MARIMUTHU, R.; NATESAN, G.; RAJAGOPAL, R. E.; JUSTIN, J. S.; MOHIDEEN, A. J. A. H.; Development of biogenic silver nano particle from pelargonium graveolens leaf extract and their antibacterial activity. **American Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 1, p. 57-64, 2013.

PARKER, R.; RING, S. G. Aspects of the physical chemistry of starch. **Journal of Cereal Science**, v. 34, p. 1-17, 2001.

PASANGULAPATI, V.; RAMACHANDRIYA, K. D.; KUMAR, A.; WILKINS, M. R.; JONES, C. L.; HUHNKE, R. L. Effects of cellulose, hemicellulose and lignina on thermochemical conversion characteristics of the selected biomass. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 663–669, 2012.

PĂVĂLOIU, R. D.; STOICA-GUZUN, A.; DOBRE, T. Swelling studies of composite hydrogels based on bacterial cellulose and gelatin. **U.P.B. Sci. Bull.**, Series B, v. 77, Iss. 1, 2015.

PICOLI, S. U.; DURÁN, M.; ANDRADE, P. F.; DURAN, N. Silver nanoparticles/silver chloride (Ag/AgCl) synthesized from *Fusarium oxysporum* acting against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) and extended spectrum beta-lactamase (ESBL). **Front Nanosci Nanotech**, v. 2, n 2, p. 107-110, 2016.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba/PR, 2007.

POLETTO, M.; ORNAGHI JÚNIOR, H. L.; ZATTERA, A. J. Native Cellulose: Structure, Characterization and Thermal Properties. **Materials**, v. 7, p. 6105-6119, 2014.

POWELL, L. C.; KHAN, S.; CHINGA-CARRASCO, G.; WRIGHT, C. J.; HILL, K. E.; THOMAS, D. W. An investigation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth on novel nanocellulose fibre dressings. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 191–197, 2016.

PRETSCH, E. BUHLMANN, P.; AFFOLTER, C.; HERRERA, A.; MARTINEZ, R. **Determinación estructural de compuestos orgânicos**. Editora Masson, p. 47, Barcelona, Espanha, 2015.

RABELO, S.C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas/SP, 2007.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 76–83, 2009.

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Ciência e Cultura**, n° 3, v. 65, p. 44-48, 2013.

RAVEENDRAN, S. PANDEY, A.; PARAMESWARAN, B. Capítulo 4 - Tratamento Alcalino. In: **Pré-tratamento da Biomassa**, p.51-60, 2015. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/282596031> Chapter 4 Alkaline Treatment>, acesso em: 04 de Junho, 2017.

RIBEIRO, C. A. **Síntese e caracterização de hidrogéis de poli (n-isopropilacrilamida) contendo sulfato de condroitina e nanopartículas de prata para aplicações biomédicas**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), Itajubá/MG, 2016.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release. **Journal of Controlled Release**, p. 23-36, 1987.

ROSA, S. M. L. **Isolamento de nanocristais de celulose de resíduos agrícolas e emprego em nanocompósitos de polipropileno**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS, 2012.

SADANAND, V.; RAJINI, N.; SATYANARAYANA, B.; VARADARAJULU, A. Preparation and properties of cellulose/silver nanoparticle composites with in situ-generated silver nanoparticles using *Ocimum sanctum* leaf extract. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 21, p. 1–9, 2016.

SALEM H. F.; EID K. A. M.; SHARAF M. A. Formulation and evaluation of silver nanoparticles as antibacterial and antifungal agents with a minimal cytotoxic effect. **International Journal of Drug Delivery**, v. 3, p. 293-304, 2011.

SANA, S. S.; DOGIPARTHI, L. K. Green synthesis of silver nanoparticles using *Givotia moluccana* leaf extract and evaluation of their antimicrobial activity. **Materials Letters**, v. 226, p. 47–51, 2018.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, J. F. L.; SANTOS, M. J. L.; THESING, A.; TAVARES, F.; GRIEP, J.; RODRIGUES, M. R. F. Ressonância de Plasmon de superfície localizado e aplicação em biossensores e células solares. **Química Nova**, v. 39, n.º. 9, p. 1098-1111, 2016.

SANTOS, J. B.; PORTO, S. G.; SUZUKI, L. M.; SOSTIZZO, L. R. Z.; ANTONIAZZI, J. L. ECHER, I. C. **Avaliação e Tratamento de feridas: orientações aos profissionais de saúde**. Hospital de Clínicas, Porto Alegre/RS, 2013. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/34755/000790228.pdf>>, acesso em 12 de Junho, 2017.

SEAPA – Secretária de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Estado de Minas Gerais. **Batata – Dados de Minas Gerais**. Disponível em: <[http://www.agricultura.mg.gov.br/images/Arq\\_Relatorios/Agricultura/2015/fev/perfil\\_batata\\_fev\\_2015.pdf](http://www.agricultura.mg.gov.br/images/Arq_Relatorios/Agricultura/2015/fev/perfil_batata_fev_2015.pdf)>, acesso em 10 de Maio, 2016.

SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN Jr., 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.

SHAHEEN, Th. I.; FOUDA, A. Green approach for one-pot synthesis of silver nanorod using cellulose nanocrystal and their cytotoxicity and antibacterial assessment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 784–792, 2018.

SHAMELI, K.; AHMAD, M. B.; ZAMANIAN, A.; SANGPOUR, P.; SHABANZADEH, P.; ABDOLLAHI, Y.; ZARGAR, M. Green biosynthesis of silver nanoparticles using Curcuma longa tuber powder. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5603–5610, 2012.

SHANKAR, S. S.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Geranium Leaf Assisted Biosynthesis of Silver Nanoparticles. **Biotechnololy Progress**, v. 9, p. 1627-1631, 2003.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, p. 83–96, 2009.

SHARMA, S.; SANPUI, P.; CHATTOPADHYAY, A.; GHOSH, S. S. Fabrication of antibacterial silver nanoparticle—sodium alginate—chitosan composite films. **RSC Advances**, v. 2, p. 5837–5843, 2012.

SHIMOYAMA, N. **A cadeia brasileira da batata: situação atual**. Disponível em: <<https://consumoymercadodepapa.wordpress.com/2014/11/28/a-cadeia-brasileira-da-batata-situacao-atual/>>, acesso em 6 de Maio, 2016.

SILVA, L. D. **Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de *Hancornia speciosa* Gomes – Apocynaceae (mangabeira)**. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília/DF, 2014.

SINGLA, R.; SONI, S.; KULURKAR, P. M.; KUMARI, A.; MAHESH, S.; PATIAL, V.; PADWAD, Y. S.; YADAV, S. K. In situ functionalized nanobiocomposites dressings of bamboo cellulose nanocrystals and silver nanoparticles for accelerated wound healing. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 152-162, 2017.

SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulosic Bionanocomposites: A review of Preparation, Properties and Application. **Polymers**, v. 2, p. 728-765, 2010.

SIVARANJANA, P.; NAGARAJAN, E. R.; RAJINI, N.; JAWAID, M.; RAJALU VARADA, A. Cellulose nanocomposite filmes with in situ generated silver nanoparticles using *Cassia alata* leaf extract as a reducing agent. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 223-232, 2017.

SJOSTROM, E. **Wood Chemistry. Fundamentals and applications**. San Diego: Academic press, p. 130, 1993.

SMANIOTTO, P. H. S. GALLI, R.; CARVALHO, V. F.; FERREIRA, M. C. Tratamento clínico das feridas – curativos. **Rev. Med.**, v. 89, p. 137-41, São Paulo/SP, 2010.

SOO-HWAN, K.; LEE, H-S.; RYU, D-S.; CHOI, S-J.; LEE, D-S. Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Korean J. Microbiol. Biotechnol**, v. 39, n°. 1, p. 77–85, 2011.

SOUZA, V. C. **Nanocristais de celulose como fase de reforço para filmes de quitosana: obtenção, caracterização e aplicação**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, 2015.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

SUN, Z.; SHEN, J.; JIN, B.; WEI, L. Combustion characteristics of cotton stalk in FBC. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 761-770, 2010.

TAMURA, H.; FURUIKE, T.; NAIR, S. V.; JAYAKUMAR, R. Biomedical applications of chitin hydrogel membranes and scaffolds. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 820–824, 2011.

TELEMAN, A. Hemicelluloses and Pectins. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. (Editores). **Pulp and Paper Chemistry and Technology: Wood Chemistry and Wood Biotechnology**. Göttingen, Alemanha: Hubert & Co. GmbH & Co. KG., v. 1, p. 101, 2009.

TIAN, J.; WONG, K. K. Y.; HO, C. M.; LOK, C. N.; YU, W. Y.; CHE, C. M.; CHIU, J. F.; TAM, P. K. H. Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing. **Chem Med Chem**, v. 2, p. 129-136, 2007.

TIWARI A. & SOUECEK M. D. **Concise encyclopedia of high performance silicones**. New York (EUA), Wiley-Scrivener Publishing, 2014.

VASILIU, S.; BUNIA, I.; RACOVITA, S.; NEAGU, V. Adsorption of cefotaxime sodium salt on polymer coated ion exchange resin microparticles: Kinetics, equilibrium and thermodynamic studies. **Carbohydr. Polym** v. 85, p. 376–387, 2011.

VIVEKANANDHAN, S; CHRISTENSEN, L.; MISRA, M.; MOHANTY, A. K. Green Process for Impregnation of Silver Nanoparticles into Microcrystalline Cellulose and Their Antimicrobial Bionanocomposite Films. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 3, p. 371-376, 2012.

VOLOVA, T. G.; SHUMILOVA, A. A.; SHIDLOVSKIY, I. P.; NIKOLAEVA, E. D.; SUKOVATYIY, A. G.; VASILIEV, A. D.; SHISHATSKAYA, E. I. Antibacterial properties of films of cellulose composites with silver nanoparticles and antibiotics. **Polymer Testing**, v. 65 p. 54–68, 2018.

WONG, K. K. Y.; LIU, X. 2010. Silver Nanoparticles – The Real “Silver Bullet” in Clinical medicine? **Med. Chem. Commun**, v.1, p.125-131.

YANG, H.; YAN, R.; CHEN, H. LEE, D. H.; ZHENG, C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, v. 86, p. 1781–1788, 2007.

ZHANG, Y-H. P.; LYND, L. R. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulose Systems. **Biotechnology and Bioengineering**, n. 7, v. 88, p. 797-824, 2004.

## APÊNDICES

Apêndice A: Dados obtidos para a determinação do grau de intumescimento (I) da membrana de celulose em soro fisiológico na temperatura de 10°C.

<b>Tempos (min)</b>	<b>Massa 1 (g)</b>	<b>Massa 2 (g)</b>	<b>Massa 3 (g)</b>	<b>Média (g)</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>I (%)</b>
0*	0,0112	0,0038	0,0041	0,0064	0,0042	0,00
1	0,0211	0,0113	0,0102	0,0142	0,0060	123,04
2	0,0282	0,0126	0,0119	0,0176	0,0092	175,92
3	0,0278	0,0141	0,0128	0,0182	0,0083	186,39
4	0,0288	0,0149	0,0134	0,0190	0,0085	198,95
5	0,0274	0,0133	0,0129	0,0179	0,0083	180,63
6	0,0293	0,0130	0,0160	0,0194	0,0087	205,24
7	0,0314	0,0178	0,0141	0,0211	0,0091	231,41
8	0,0328	0,0166	0,0141	0,0212	0,0102	232,46
9	0,0317	0,0149	0,0136	0,0201	0,0101	215,18
10	0,0302	0,0200	0,0158	0,0220	0,0074	245,55
30	0,0326	0,0160	0,0138	0,0208	0,0103	226,70
60	0,0328	0,0161	0,0142	0,0210	0,0102	230,37

\*Massa inicial obtida após secagem em estufa a 50°C, por 16h.

Apêndice B: Dados obtidos para a determinação do grau de intumescimento (I) da membrana de celulose em soro fisiológico na temperatura de 25°C.

<b>Tempos (min)</b>	<b>Massa 1 (g)</b>	<b>Massa 2 (g)</b>	<b>Massa 3 (g)</b>	<b>Média (g)</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>I (%)</b>
0*	0,0082	0,0042	0,0125	0,0083	0,0042	0,00
1	0,0285	0,0163	0,0338	0,0262	0,0090	215,66
2	0,0297	0,0203	0,0409	0,0303	0,0103	265,06
3	0,0288	0,0203	0,0421	0,0304	0,0110	266,27
4	0,0277	0,0216	0,0386	0,0293	0,0086	253,01
5	0,0287	0,0224	0,0367	0,0293	0,0072	252,61
6	0,0288	0,0229	0,0404	0,0307	0,0089	269,88
7	0,0356	0,0216	0,0397	0,0323	0,0095	289,16
8	0,0295	0,0211	0,0379	0,0295	0,0084	255,42
9	0,0343	0,0237	0,0454	0,0345	0,0109	315,26
10	0,0329	0,0265	0,0385	0,0326	0,0060	293,17
30	0,0276	0,0215	0,0416	0,0302	0,0103	264,26
60	0,0266	0,0260	0,0396	0,0307	0,0077	270,28

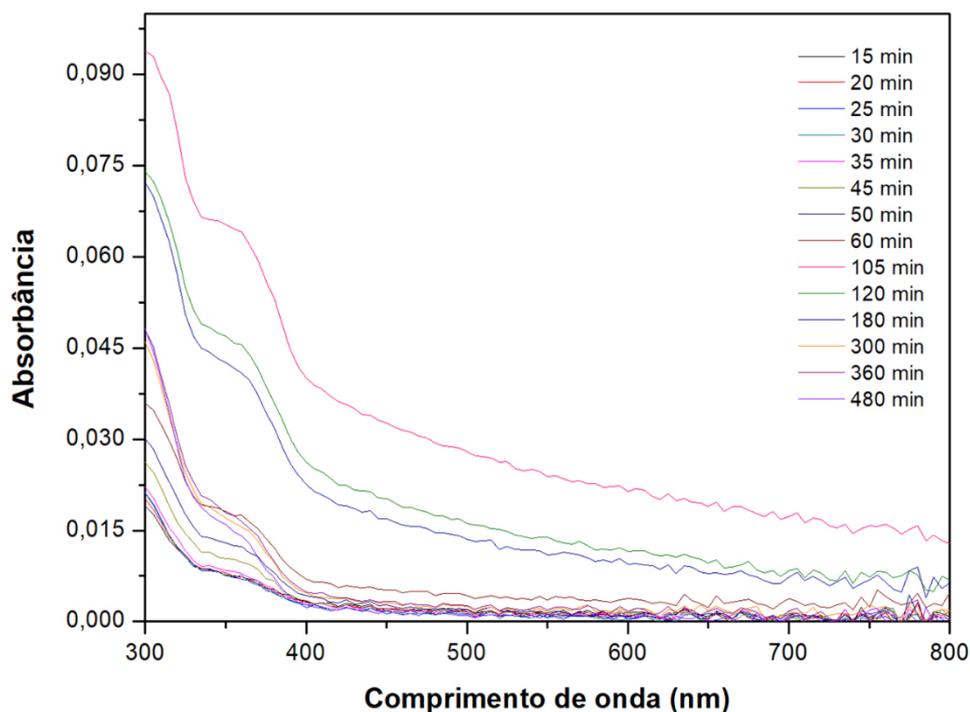
\*Massa inicial obtida após secagem em estufa a 50°C, por 16h.

Apêndice C: Dados obtidos para a determinação do grau de intumescimento (I) da membrana de celulose em soro fisiológico na temperatura de 40°C.

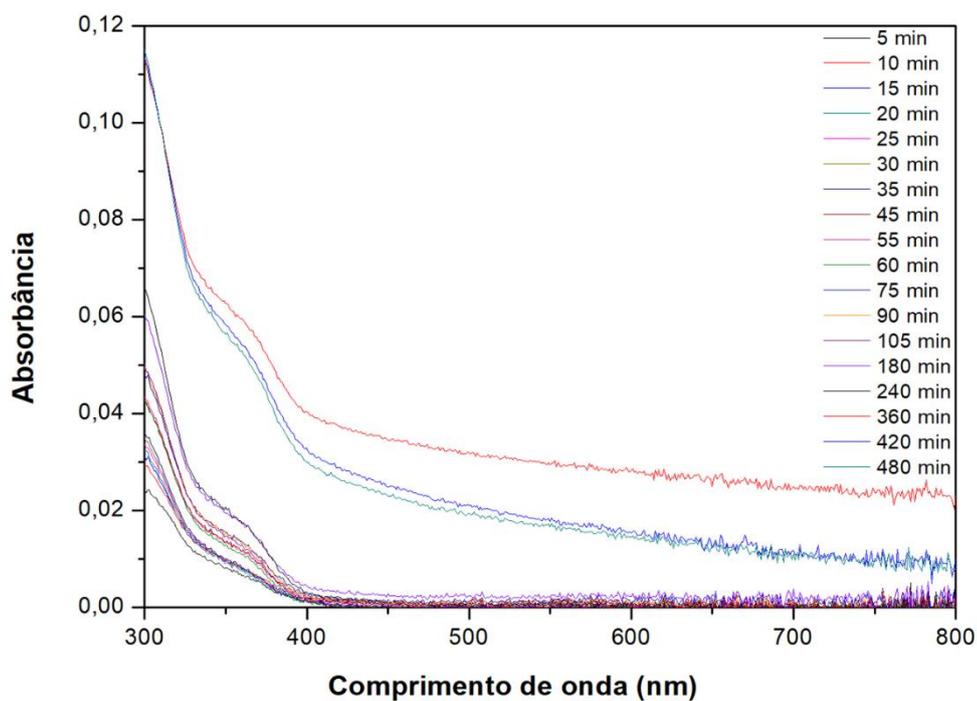
Tempos (min)	Massa 1 (g)	Massa 2 (g)	Massa 3 (g)	Média (g)	Desvio Padrão	I (%)
0*	0,0184	0,0060	0,0027	0,0090	0,0083	0,00
1	0,0397	0,0201	0,0130	0,0243	0,0138	168,63
2	0,0463	0,0224	0,0146	0,0278	0,0165	207,38
3	0,0489	0,0198	0,0121	0,0269	0,0194	198,15
4	0,0480	0,0235	0,0136	0,0284	0,0177	214,02
5	0,0510	0,0223	0,0120	0,0284	0,0202	214,76
6	0,0464	0,0234	0,0143	0,0280	0,0165	210,33
7	0,0507	0,0216	0,0128	0,0284	0,0198	214,02
8	0,0497	0,0194	0,0111	0,0267	0,0203	195,94
9	0,0503	0,0237	0,0140	0,0293	0,0188	224,72
10	0,0523	0,0224	0,0144	0,0297	0,0200	228,78
30	0,0545	0,0236	0,0136	0,0306	0,0213	238,38
60	0,0540	0,0239	0,0134	0,0304	0,0211	236,90

\*Massa inicial obtida após secagem em estufa a 50°C, por 16h.

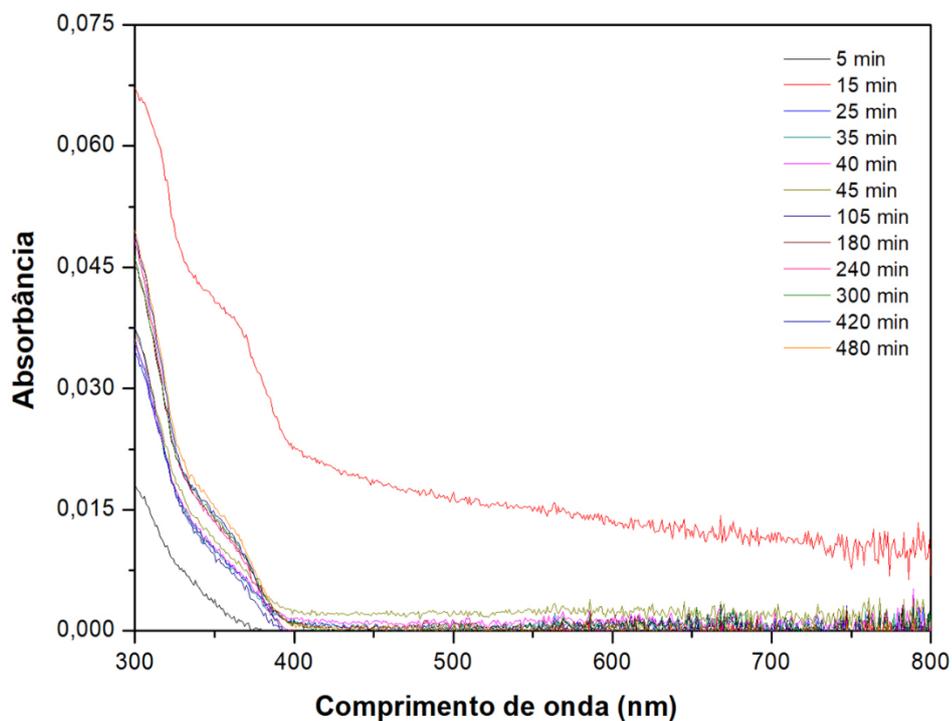
Apêndice D: Liberação das Np-Ag a partir do biocompósito FC/Np-Ag relacionando absorbância x comprimento de onda, para a temperatura de 23°C.



Apêndice E: Liberação das Np-Ag a partir do biocompósito FC/Np-Ag relacionando absorvância x comprimento de onda, para a temperatura de 30°C.



Apêndice F: Liberação das Np-Ag a partir do biocompósito FC/Np-Ag relacionando absorvância x comprimento de onda, para a temperatura de 37°C.



Apêndice G: equações do ajuste exponencial do perfil de liberação das Np-Ag a partir do biocompósito FC/Np-Ag, nas temperaturas de 23, 30 e 37°C.

Temperatura (°C)	Equação	Ajuste Exponencial
23	$y = -7,631E-4 \exp(-x/46,23099) - 0,00662(-x/46,23099) + 0,00965$	$R^2 = 0,8853$
30	$y = -0,00306 \exp(-x/104,1373) - 0,00293(-x/104,13729) + 0,00951$	$R^2 = 0,9122$
37	$y = 0,08089 \exp(-x/31,47181) - 0,08516(-x/30,82485) + 0,00661$	$R^2 = 0,9388$

Apêndice H: diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano e desvios padrão para o teste de sensibilidade bacteriana às Np-Ag.

Amostra	<i>E. Coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	Média (mm)	Desvio Padrão	Média (mm)	Desvio Padrão
Membrana no extrato	-	-	-	-
FC/Np-Ag 1 mM	13,76	0,59	12,86	0,81
FC/Np-Ag 2 mM	12,06	1,72	15,75	0,42
FC/Np-Ag 3 mM	12,45	1,38	13,51	0,47
FC/Np-Ag 4 mM	14,06	0,82	14,38	1,63
FC/Np-Ag 5 mM	17,11	0,88	16,47	1,12