



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CASSIANO BORGES DE MORAES

**POLISSACARÍDEOS FUNCIONALIZADOS COM ARGININA
COMO PLATAFORMA PARA ASSOCIAÇÃO COM
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Londrina
2021

CASSIANO BORGES DE MORAES

**POLISSACARÍDEOS FUNCIONALIZADOS COM ARGININA
COMO PLATAFORMA PARA ASSOCIAÇÃO COM
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer.

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M827p Moraes, Cassiano Borges de.

Polissacarídeos funcionalizados com arginina como plataforma para associação com nanopartículas de prata / Cassiano Borges de Moraes. - Londrina, 2021.
73 f. : il.

Orientador: Cesar Augusto Tischer.

Coorientador: Renato Márcio Ribeiro Viana.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2021. Inclui bibliografia.

1. Funcionalização de polissacarídeos - Tese. 2. Química de carboidratos - gomas ácidas - Tese. 3. Nanopartículas de prata - Tese. 4. Compósitos poliméricos - Tese. I. Tischer, Cesar Augusto. II. Viana, Renato Márcio Ribeiro. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 66

CASSIANO BORGES DE MORAES

**POLISSACARÍDEOS FUNCIONALIZADOS COM ARGININA
COMO PLATAFORMA PARA ASSOCIAÇÃO COM
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Carla Cristina Perez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 22 de fevereiro de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Selma Borges por sempre ser a maior inspiração e suporte ao longo da minha vida, por acreditar, apoiar, valorizar e incentivar todos os caminhos nos quais eu estive. É um prazer ser filho de uma mulher tão forte e que mesmo estando há quase 500 km de distância ao longo desses sete anos, sempre se faz presente. Obrigado por tudo, mãe.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de dar continuidade aos estudos em um programa com um excelente corpo docente, sempre disposto a auxiliar os membros do programa da melhor maneira possível e a CAPES pela bolsa de estudos que possibilitou a realização da presente pesquisa.

Ao Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer por aceitar ser meu orientador durante o mestrado, dando continuidade a parceria construída ao longo desses cinco anos. Obrigado pela paciência, por atender os meus checklists, pelas risadas e indicações, e por todo aprendizado nos meus anos dentro da universidade.

Ao Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, à Central Multiusuária da UEL pelo apoio estrutural fornecido pelo Laboratório de Espectroscopia – LABESPEC e o Laboratório de Análises por Raios-X – LARX, em especial a Natalia Romero e Alexandre Urbano pela disponibilidade e apoio para a obtenção dos resultados e a AINTEC-UEL pela assessoria no processo de produção de propriedade intelectual.

A todos os colaboradores do departamento de Bioquímica e Biotecnologia pelo auxílio durante as atividades. Aos professores pelas disciplinas ofertadas e conhecimentos transmitidos que, sem dúvida, me inspiraram ao longo do curso. Aos zeladores e técnicos, sempre disponíveis para que as atividades ocorram da melhor maneira possível.

Aos meus queridos amigos da minha cidade natal, São Paulo, que acompanharam toda a minha trajetória em Londrina. Adriano Araújo, Adriano Hero, Alisson Traldi e Fagner Marques, agradeço recarregarem minhas energias a cada volta para casa e por sempre acreditarem em mim. Tenho certeza que fez toda a diferença.

A minha família construída em Londrina, em especial ao meu grande

amigo Diego Vieira por nunca me deixar sozinho, à Tatiana Jabor pelos sorrisos compartilhados, ao Vinicius Mascareli e Gabriel Facin dos quais me sinto à vontade para chamar de irmão e a Gabriella Andriani e Lucas Lopes, pela parceria de sempre.

A Universidade Estadual de Londrina, da qual tenho muito orgulho em fazer parte da comunidade acadêmica, local que sempre lembrarei por viver tantas etapas importantes e por presentear, até nos dias mais nublados, o melhor pôr do sol.

Aos membros da banca, Professora Carla e Professor Gerson por aceitarem prontamente o convite de fazer parte desta importante etapa da minha carreira acadêmica.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

MORAES, Cassiano Borges de. **Polissacarídeos funcionalizados com arginina como plataforma para associação com nanopartículas de prata**. 2021. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

No campo dos glicoconjugados diversos biomateriais são desenvolvidos e utilizados comercialmente na área da saúde como ferramenta para os mais diversos tratamentos que envolvem processos de regeneração celular. A celulose bacteriana tem alta biocompatibilidade e sua utilização como suporte para a promoção de sua capacidade cicatrizante pode ser alcançado com a adição de materiais à sua superfície como proteínas de interesse e aminoácidos para associação com nanopartículas metálicas. Para a conjugação com estes compostos aminados, utiliza-se um espaçador com grupo ácido carboxílico como o ácido succínico para tornar a membrana reativa. Funcionalizar a celulose bacteriana com grupos ácidos provenientes de outros polissacarídeos pode ser uma alternativa interessante para diminuir os impactos ambientais inerentes ao processo de succinilação. Uma alternativa é a adição de gomas ácidas, como as gomas arábica e karaya (origem vegetal) e a goma xantana (origem bacteriana) durante a fermentação, a fim de promover o aumento da reatividade da celulose bacteriana mantendo as propriedades dos biopolímeros. Uma vez associados a celulose, estes polissacarídeos naturais formulam um biomaterial de partida para síntese de amidas. O objetivo deste trabalho foi avaliar e viabilizar a inserção de gomas à superfície da celulose bacteriana durante o processo fermentativo e funcionalizar o aminoácido arginina em gomas ácidas por meio de uma reação de síntese de amida e, havendo indícios da formação da ligação, associar nanopartículas de prata à superfície do produto. A incorporação de gomas durante o processo fermentativo aumentou a acidez dos compostos, que foram quantificados por meio de derivadas de suas respectivas curvas de titulação bem como pelos índices de cristalinidade provenientes do DRX, que apresentaram baixos valores quando comparados as membranas de celulose nativa. Dentre as gomas utilizadas a que apresentou maior influência nas reações de funcionalização e inserção na rede nanofibrilar da celulose bacteriana foi a goma karaya demonstrado pelas técnicas de caracterização (FTIR, DRX e DSC) e justificado pelo mecanismo de reação. O produto da funcionalização de goma karaya com arginina foi associado às nanopartículas de prata de maneira efetiva como demonstrado pela caracterização por meio da espectroscopia UV-Vis e pela atividade antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa*, sugerindo este polissacarídeo como uma alternativa no ramo da química de carboidratos para síntese de amidas e associação com nanopartículas metálicas.

Palavras-chave: gomas ácidas; goma karaya; funcionalização; nanopartícula de prata; celulose bacteriana; compósitos poliméricos.

MORAES, Cassiano Borges de. **Polysaccharides functionalized with arginine as a platform for association with silver nanoparticles.** 2021. 72 p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) - State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

In the glycoconjugates area, several biomaterials are developed and used commercially in the health field as a tool in the most diverse treatments that involve cell regeneration processes. Bacterial cellulose has high biocompatibility and its functionalization with grown promoter peptides or proteins as well with aminoacids that associated with metallic nanoparticles can modulate its healing capacity. For conjugation with these amino compounds, a spacer with a carboxylic acid group such as succinic acid is used to make the membrane reactive. Functionalize bacterial cellulose with acid groups from other polysaccharides can be an interesting alternative to avoid the formation of environmental wastes inherent to the succinilation process. An alternative is the addition of acid gums, such as arabic and karaya gum (vegetable origin) and xanthan gum (bacterial origin) during fermentation process, that lead to bacterial cellulose based membrane reactivity while maintaining the properties of biopolymers. Once associated with cellulose, these natural polysaccharides form a starting biomaterial for the synthesis of amides. The objective of this work was to make possible the insertion of gums on the surface of bacterial cellulose during the fermentation process and to functionalize the amino acid arginine in acid gums by means of an amide synthesis reaction and to associate silver nanoparticles to the product. The incorporation of gums during the fermentation process increased the acidity of the membrane, which were quantified by titration. The tritration curves as well the crystallinity indexes from the XRD diffractograms, which showed low values when compared to native cellulose membranes induces to conclude that the acidic gums was trapped on the nanocellulose film. Among the gums used, the one that had the greatest influence on the functionalization and insertion reactions in the nanofibrillar network of bacterial cellulose was the karaya gum demonstrated by the characterization techniques (FTIR, XRD and DSC) and justified by the reaction mechanism. The product of karaya gum was conjugated with arginine, that acted as reductive agent to obtain silver nanoparticles in an effective way, as demonstrated by the characterization through UV-vis spectroscopy and by the antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*,, showing up this polysaccharide as an alternative in the field of carbohydrate chemistry for the synthesis of amides and association with nanoparticles metallic.

Key words: acid gums; karaya gum; functionalization; silver nanoparticle; bacterial cellulose; polymeric composites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da celulose bacteriana evidenciando as ligações de hidrogênio.	20
Figura 2 - Via de biossíntese da celulose bacteriana evidenciando a celulase sintase.....	21
Figura 3 - Estrutura química da goma karaya.....	24
Figura 4 - Estrutura dos ácidos presentes na goma karaya	24
Figura 5 - Estrutura da goma xantana	25
Figura 6 - Principais constituintes da cadeia polimérica da goma arábica.....	27
Figura 7 - Reação geral de um ácido carboxílico com amina.	28
Figura 8 - Mecanismo envolvendo um ácido carboxílico e o agente carbodiimida para a formação de um intermediário reativo.....	29
Figura 9 - Mecanismo envolvendo o intermediário reativo e uma amina (etilenodiamina) tendo como produto uma amida e o subproduto uréia.	30
Figura 10 - Estrutura da arginina.....	31
Figura 11 - Complexação da arginina com a prata e os valores de comprimento de ligação em ângstrons.....	31
Figura 12 - Variação de cor relacionado com o tamanho e forma da AgNP.....	32
Figura 13 - Processo de produção de membranas de celulose nativa e dos compostos celulose-goma.....	35
Figura 14 - Membranas de celulose bacteriana nativa (MCB) e com gomas ácidas inseridas durante o processo fermentativo MCBGA (com goma Arábica), MCBGX (goma Xantana) e MCBGK (goma Karaya).....	39
Figura 15 - Aspectos dos compostos GAEDCARG, GKEDCARG e GXEDCARG.....	40
Figura 16 - Esquema de reação dos compostos poliméricos com arginina.....	40
Figura 17 - Proposta de mecanismo da funcionalização dos grupos ácidos disponíveis nas gomas com arginina utilizando EDC e NHS	42
Figura 18 - Proposta de interação e complexação da prata no polímero conjugado com arginina.	43

Figura 19 - Espectro de FT-IR da membrana de celulose bacteriana sem gomas.	44
Figura 20 - Espectros de FT-IR dos filmes de celulose com adição de gomas ácidas.....	44
Figura 21 - Espectro de FT-IR da arginina	46
Figura 22 - Espectro de FT-IR da funcionalização de goma arábica com arginina.	46
Figura 23 - Espectro de FT-IR da funcionalização de goma karaya com arginina.	47
Figura 24 - Espectro de FT-IR da funcionalização de goma xantana com arginina.	49
Figura 25 - Complexação entre os grupos de uma estrutura polimérica.	49
Figura 26 - Curvas de titulação e sua respectiva curva de primeira derivada dos compostos celulose-goma.....	51
Figura 27 - Curva de segunda derivada dos compostos celulose-goma.....	52
Figura 28 - Curvas de DSC para MCB comparando com MCBGA, MCBGK e MCBGX.	54
Figura 29 - Perfil de DSC para a arginina.....	55
Figura 30 - Curvas de DSC para GA e GX e suas funcionalizações com ARG.	56
Figura 31 - Curvas de DSC para GK e sua funcionalização com ARG.	57
Figura 32 - Difratoograma comparativo entre amostras MCB, MCBGA e MCBGX.	58
Figura 33 - Difratoograma comparativo entre amostras MCB e MCBGK.	59
Figura 34 - Difratoograma comparativo entre GK e GKEDCARG	59
Figura 35 - Difratoograma da arginina.....	60
Figura 36 - Solução de AgNP a partir do método borohidreto.....	61
Figura 37 - Espectro de Uv-vis da suspensão (a) de nanopartículas de prata e (b) GKEDCARG-AgNP.....	62
Figura 38 - Antibiógrama de GK vs GKEDCARG-AgNP frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicações da celulose bacteriana na área biomédica.....	22
Tabela 2 - Relação entre o comprimento de onda e o tamanho da nanopartícula.....	32
Tabela 3 - Formulação adaptada do meio HS para a produção de celulose bacteriana.....	33
Tabela 4 - Equações para a primeira e segunda derivada das curvas de titulação.....	37
Tabela 5 - Determinação do índice de cristalinidade pelo método de Segal.	38
Tabela 6 - Valores de pH obtidos para cada membrana.	50
Tabela 7 - Índice de cristalinidade (Ic) a partir de DRX para a MCB e os produtos celulose-goma.....	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CB	Celulose Bacteriana
BAAR	Bactérias Álcool Ácido Resistentes
DBBTEC	Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
DSC	Calorimetria Diferencia Exploratória (Differential Scanning Calorimetry)
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide
GA	Goma Arábica
GAEDCARG	Goma Arábica funcionalizada com arginina
GK	Goma Karaya
GKEDCARG	Goma Karaya funcionalizada com arginina
GKEDCARG-AgNP	Goma Karaya funcionalizada com arginina associada a nanopartículas de prata
GX	Goma Xantana
GXEDCARG	Goma Xantana funcionalizada com arginina
HS	Hestrim-Schramm's
MCB	Membrana de celulose bacteriana
MCBGA	Membrana de celulose bacteriana + goma arábica
MCBGK	Membrana de celulose bacteriana + goma karaya
MCBGX	Membrana de celulose bacteriana + goma xantana
AgNP	Nanopartículas de prata
T _g	Temperatura de transição vítrea
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta e visível.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	POLISSACARÍDEOS COMO MATRIZ PARA MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL	18
3.2	CELULOSE BACTERIANA	19
3.2.1	Condições de Produção e Biossíntese.....	20
3.2.2	Aplicação da Celulose Bacteriana no Campo Biomédico.....	22
3.3	GOMA ÁCIDAS	23
3.3.1	Goma Karaya	23
3.3.2	Goma Xantana	25
3.3.3	Goma Arábica	26
3.4	AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS ASSOCIADOS A MATRIZES POLIMÉRICAS	27
3.4.1	Reações de Substituição a Carbonila – Ligação Amida (Mecanismo).....	28
3.5	NANOPARTÍCULAS DE PRATA ASSOCIADAS A AMINOÁCIDOS.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	EQUIPAMENTOS E REAGENTES	33
4.2	PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA.....	33
4.2.1	Microorganismo, Estoque e Meio de Cultura.....	33
4.2.2	Processo de Produção de Membranas de Celulose Bacteriana e Adição de Gomas Ácidas	34
4.3	FUNCIONALIZAÇÃO DAS GOMAS ÁCIDAS COM COMPOSTOS AMINADOS	36
4.4	INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO PRODUTO DA FUNCIONALIZAÇÃO	36
4.5	PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PELO MÉTODO DO BORO HIDRETO.	36

4.6	MÉTODOS FÍSICO E QUÍMICOS E CARACTERIZAÇÃO	37
4.6.1	Quantificação da Acidez dos Filmes Formados	37
4.6.2	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	37
4.6.3	Análise Térmica por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	37
4.6.4	Difração de Raios-X (DRX)	38
4.6.5	Espectroscopia UV-Vis.....	38
4.6.6	Antibiograma do Material Funcionalizado e Associado com AgNP	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	ESTUDO ESTRUTURAL E EFEITOS DA REAÇÃO DE SÍNTESE.....	40
5.1.1	Conjugação das Gomas Ácidas com o Aminoácido Arginina.....	40
5.1.2	Formação de Nanopartícula de Prata na Superfície Polimérica.....	42
5.2	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	43
5.3	QUANTIFICAÇÃO DE ACIDEZ DOS COMPOSTOS CELULOSE-GOMA.....	50
5.4	ESTUDO TÉRMICO POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	52
5.5	AVALIAÇÃO DA CRISTALINIDADE DA CELULOSE E DOS COMPOSTOS POLIMÉRICOS POR DIFRAÇÃO DE RAIO-X.....	57
5.6	ESPECTROSCOPIA UV-VIS DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA PRODUZIDAS E DA SUSPENSÃO DO PRODUTO LIGADO À PRATA.	61
5.7	ANTIBIOGRAMA	62
6	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS.....	65
	ANEXO – DEPÓSITO DE PATENTE	70

1 INTRODUÇÃO

A celulose bacteriana apresenta uma rede entrelaçada nanofibrilar ultrafina, bem organizada, o que resulta em alta porosidade e aspecto mais aderente quando comparada a celulose vegetal. Além disso, as membranas de celulose bacteriana exibem alta capacidade de retenção de água não tóxica e, devido à alta cristalinidade, boa resistência mecânica. Características que promovem esse material como interessante plataforma para modificação química, para aplicações no campo biomédico como curativo, substituição de cartilagem, pele artificial, enxertos vasculares, tecido e regeneração óssea, vasos sanguíneos artificiais, almofadas de médicos, matriz na engenharia de tecidos e implantes dentários (CORRAL *et al.*, 2017; TRONSER *et al.*, 2018).

Biopolímeros já foram incorporados em membranas de celulose bacteriana, como sericina de seda e quitosana reforçadas com óxido de grafeno, que se mostraram potencializadores da cicatrização de feridas. Filmes de alginato-celulose carregados com sulfadiazina de prata foram desenvolvidos como potenciais curativos, assim como nano-compostos com celulose-hialurônico que são utilizados para o reparo clínico da pele (LI *et al.*, 2016; LAMBONI *et al.*, 2016).

As gomas são moléculas com elevada massa molecular, com propriedades coloidais e capacidade de produzir géis, podendo ser tanto de origem vegetal quanto de origem microbiana. A goma karaya, de origem vegetal, possui grande viscosidade e adesividade, e suas vantagens estão atribuídas a sua estrutura. A Food and Drug Administration (FDA) estabelece que aproximadamente de 30 % a 43 % da goma karaya é constituída de ácido galacturônico e ácido glucurônico e a possibilidade desses ácidos serem reativos promove grande interesse nesse polissacarídeo e seus componentes e que sua modificação estrutural pode gerar um produto com alta aceitação tecidual.

Dentre as gomas microbianas, a xantana se destaca por suas propriedades reológicas distintas, levando a sua aplicação nos mais diversos segmentos industriais, entre os quais cosméticos, petroquímicos, alimentos e fármacos se destacam. Suas características, como elevada viscosidade, mesmo em baixas concentrações (0,05 a 1,0%), pseudoplasticidade, estabilidade com sais metálicos e em ampla faixa de pH e temperatura, justificam a sua ampla utilização na indústria (LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009).

Devido à baixa toxicidade, biocompatibilidade com metais, custo-benefício e disponibilidade, a goma arábica apresenta ampla aplicação industrial, sendo encontrada na indústria alimentícia e farmacêutica como uma opção para o desenvolvimento de novos produtos. Sua variedade de aplicação é justificada pela variedade das unidades monossacarídicas presentes em sua estrutura polimérica, que favorece a complexação com metais, aminoácidos e proteínas (ATGIÉ *et al.*, 2019).

A estratégia em geral, para a conjugação de aminas em carboidratos, está condicionada a presença de um grupo ácido para ocorrência da reação. A inserção deste grupo pode ocorrer por adição de um grupo espaçador (RIBEIRO-VIANA; FARIATISCHER; TISCHER, 2016a), formulação de filmes (PICHETH *et al.*, 2017), ou associação entre polímeros (CACICEDO *et al.*, 2016). A disponibilidade deste grupo para reação pode fornecer uma matriz para associação com proteínas de interesse como o colágeno ou aminoácidos como arginina para associação com nanopartículas metálicas fornecendo ao produto atividade bactericida comprovada frente a bactérias álcool ácido resistentes (BAAR), como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium tuberculosis* (ABDOLYOUSEFI *et al.*, 2020; (JAFARI *et al.*, 2016).

Crescentes avanços no desenvolvimento de materiais por meio de processos biotecnológicos e as reações de funcionalização se mostram como uma eficiente alternativa para atribuição de novas propriedades aos biomateriais por meio da formulação de compósitos poliméricos associados com diferentes ligantes. O presente trabalho apresenta a proposta de uma metodologia para formar uma blenda de biopolímeros de origem microbiana e vegetal, mantendo suas principais propriedades e disponibilizando grupos ácidos passíveis de funcionalização. Uma vez obtidos estes materiais, a produção de um biomaterial conjugado com o aminoácido arginina para associação com nanopartículas de prata (AgNP) com propriedades antimicrobianas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a inserção de gomas ácidas (goma arábica, karaya e xantana) à membrana de celulose bacteriana durante o processo fermentativo para funcionalização com arginina e associação de nanopartículas de prata.

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir celulose bacteriana com adição de goma arábica, goma karaya e goma xantana no processo fermentativo;
- Caracterizar a presença das gomas incorporadas às membranas de celulose por Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR), quantificação de acidez, Difração de Raios-X (DRX) e Análise térmica (DSC);
- Conjugar arginina às gomas ácidas e identificar sua presença;
- Caracterizar os produtos obtidos por Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Difração de Raios-X (DRX) e Análise térmica (DSC);
- Produzir e caracterizar nanopartículas de prata como referência e associar nanopartículas de prata à superfície do composto goma-arginina;
- Caracterizar o produto da reação de goma funcionalizada com arginina e AgNPs por meio de Espectroscopia Uv-Vis;
- Caracterizar a atividade antimicrobiana de goma funcionalizada com arginina e AgNPs

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Polissacarídeos como matriz para modificação estrutural

Os polissacarídeos são constituídos por anidro-monossacarídeos unidos por ligações covalentes α ou β , assim o principal grupo reativo encontrado na maioria dos carboidratos são as hidroxilas. Quimicamente, há três fatores que modulam a modificação covalente de polissacarídeos: solubilidade, a extensa rede de ligação de hidrogênio e a baixa reatividade da hidroxila como nucleófilo. As duas primeiras características estão correlacionadas, a grande extensão de possibilidades de ligação de hidrogênio dentro da estrutura de polissacarídeos, variando muito, desde polímeros completamente amorfos e sem um padrão regular de ligação até a distribuição repetitiva e regular como na celulose que a torna menos suscetível a realizar outras interações com moléculas de solvente, mesmo as polares, como água ou DMSO (GARDNER; BLACKWELL, 1974; PINKERT *et al.*, 2009).

No caso da celulose, a linearidade e regularidade das ligações de hidrogênio infere ao polissacarídeo permanecer no estado sólido por apresentar baixa solubilidade frente a diversos solventes, apresentando um baixo desempenho em quase qualquer tipo de reação química. As reações químicas mais comuns dependem da colisão apropriada entre diferentes moléculas para ocorrerem em fase heterogênea, esses choques ocorrem apenas na superfície do material e, portanto, não são muito eficientes. A outra desvantagem é a própria hidroxila. Diferentemente dos grupos amina, apresentados nas proteínas, os grupos álcoois são menos nucleofílicos que as aminas devido a sua maior eletronegatividade. Assim, para que as reações ocorram, as hidroxilas têm que ser desprotonadas, geralmente por uma base forte ou o eletrófilo usado tem que ser mais forte, por exemplo cloretos de acila. A combinação desses três fatores restringe as alternativas de reações químicas úteis quando comparadas com a modificação química orgânica clássica, embora muitas metodologias tenham encontrado meios de modificar a celulose (GATENHOLM; KLEMM, 2010; CACICEDO *et al.*, 2016).

Por outro lado, essa dificuldade em modificar estruturas poliméricas é um campo muito atraente a ser estudado, sem mencionar a utilidade de selecionar o grupo químico apropriado para uma função desejada. A estratégia em geral, para a conjugação com aminas depende da presença de um grupo ácido, inserido como um grupo espaçador. O ácido succínico foi a opção de Ribeiro-Viana, Faria-Tischer e Tischer (2016), que

realizaram uma ligação covalente entre uma proteína (colágeno) à superfície da celulose bacteriana. Já Godinho e colaboradores (2016) optaram por produzir um filme composto de celulose bacteriana e compostos de *Aloe vera*, como ligninas, saponinas, ácido salicílico e aminoácidos, enquanto LIANG e colaboradores (2015) desenvolveram um aerogel de nanofibra de carbono derivado de celulose bacteriana para ser utilizado como um eletrocatalisador para a redução de oxigênio para baterias de zinco.

3.2 Celulose Bacteriana

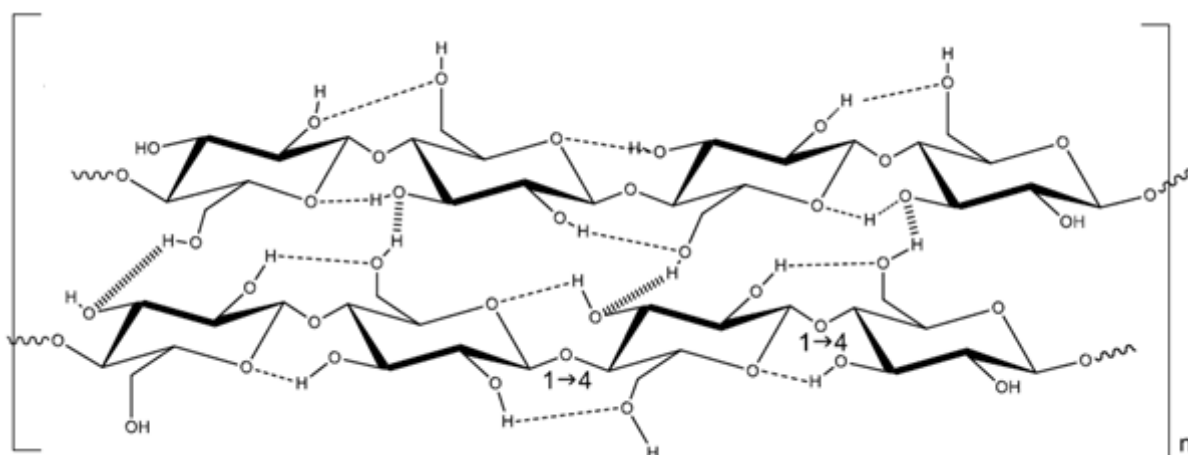
A celulose bacteriana é um polissacarídeo estrutural formado a partir de unidades β -glucanas (1-4). O polímero é quimicamente idêntico à de origem vegetal, porém possui a vantagem de não possuir junto a sua estrutura nativa biopolímeros estruturais ou hemicelulósicos, lignina ou outros metabólitos de difícil remoção encontrados na celulose de plantas. Essas vantagens, somadas a sua abundância e biodegradabilidade, tornou esse biomaterial um grande atrativo para diversos pesquisadores nas mais diferentes áreas (ENDLER; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ; PERSSON, 2010; MAUTNER, 2020) Os principais produtos comercializados com a celulose bacteriana como base são para aplicação como curativo, uma vez que esse material pode acelerar o processo de cicatrização, principalmente por apresentar resistência mecânica, alta troca gasosa, possibilidade de respiração celular, capacidade de mimetizar a matriz extracelular natural, alta capacidade de absorção, além de possuir uma fácil e indolor remoção, não tóxico e não alergênico (YE *et al.*, 2018).

A estrutura da celulose bacteriana (CB) apresenta uma rede nanofibrilar entrelaçada pelas ligações de hidrogênio formadas pelas hidroxilas das unidades de glicose presentes ao longo da cadeia polimérica, como demonstrado pela Figura 1. As ligações de hidrogênio, tanto as intermoleculares como as intramoleculares, são responsáveis por atribuir a esse composto propriedades intrínsecas como tração, rigidez e a possibilidade de retenção de água de até 100 vezes o seu peso, bem como um elevado grau de polimerização e um alto índice de cristalinidade (VITTA; THIRUVENGADAM, 2012).

As aplicações da celulose estão diretamente relacionadas à funcionalização de suas hidroxilas disponíveis por outros grupos de interesse. A natureza do substituinte pode possibilitar a interação com a membrana, e sua modificação pode ocorrer tanto por sínteses a fim de promover ligações covalentes ou interações

eletroestáticas; ou pela associação de compostos capazes de interagir com a matriz polimérica modificando-a estruturalmente. De modo a manter ou potencializar suas propriedades mecânicas e biológicas (GARDNER; BLACKWELL, 1974).

Figura 1 - Estrutura química da celulose bacteriana evidenciando as ligações de hidrogênio.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.1 Condições de produção e biossíntese

A metodologia clássica utilizada para o cultivo de celulose bacteriana foi descrita por Hestrin e Schramm (1954) envolvendo a bactéria gram-negativa *Komagataeibacter xylinum* (anteriormente *Gluconacetobacter xylinus*) utilizando glicose como substrato, com aplicação de aeração durante um cultivo estático.

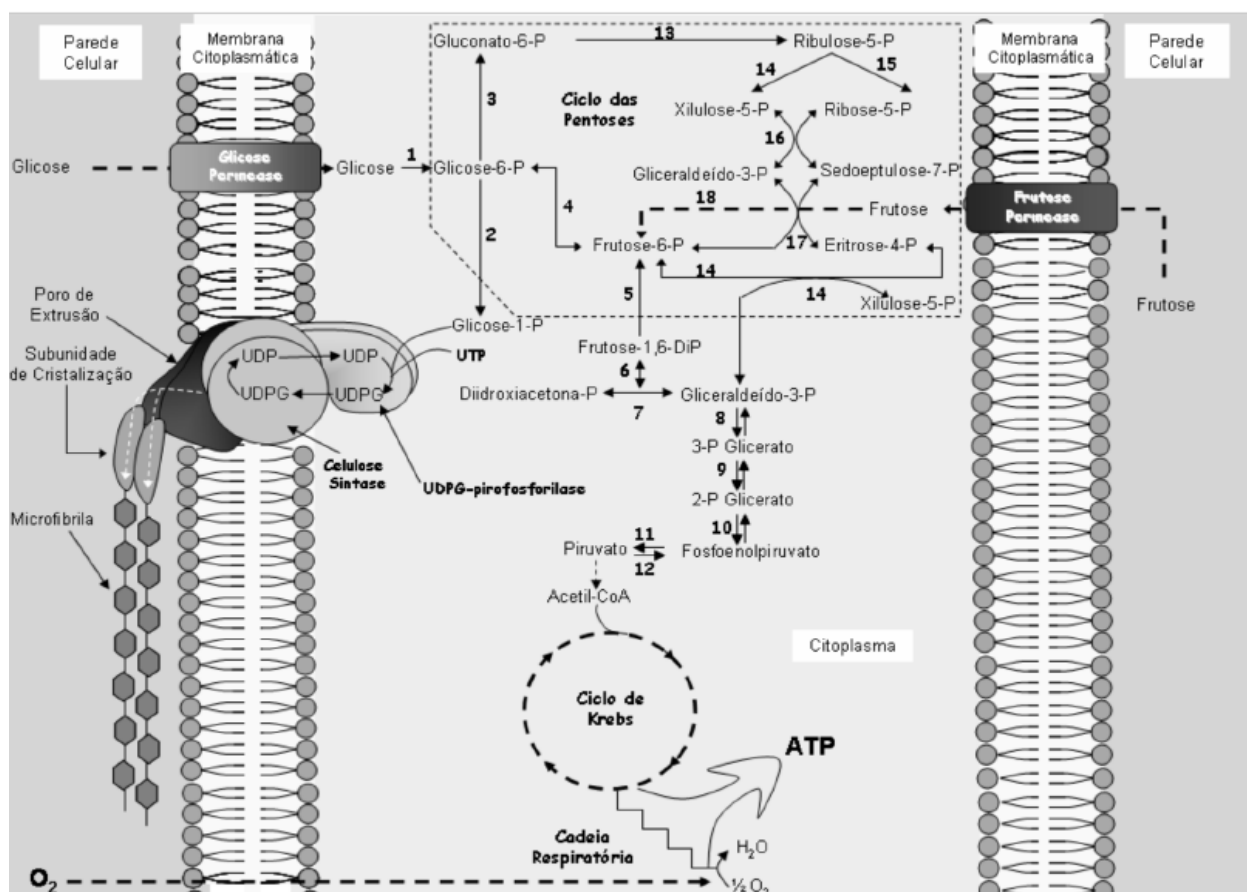
As bactérias do gênero *Komagataeibacter*, *Acetobacter* e *Gluconacetobacter* produzem celulose de modo extracelular, diretamente relacionado ao crescimento celular e concorrência de oxidação de açúcares, de forma que as células mesmo em meios desprovidos de fontes de nitrogênio continuam produzindo celulose se houver disponibilidade adequada de carboidratos e apesar de trabalhos sugerirem fontes de carbono como maltose, frutose, glicerol e a utilização de resíduos, a fonte de carbono mais utilizada é a glicose. Em escala industrial, são apresentadas diversas soluções com o intuito de utilizar diferentes substratos com o objetivo de diminuir o custo de produção deste biomaterial (HESTRIN; SCHRAMM, 1954; TSOUKO et al., 2015).

Outros fatores determinantes para o cultivo são o pH e a temperatura, que podem variar de acordo com a fonte de carbono utilizada. A faixa de pH ótimo está entre

4,0 a 6,0 e a temperatura de 28°C a 30°C. O crescimento deve ser acompanhado minuciosamente pois o acúmulo de precursores da biossíntese de celulose bacteriana pode alterar a formação da membrana em cultivo estático (LIN *et al.*, 2013; BILGI *et al.*, 2016).

Quanto a sua biossíntese (Figura 2), a celulose tem a UDP-glicose (uridina difosfato-glicose) como principal precursor. A formação deste nucleotídeo glicosilado composto ocorre pela fosforilação das hexoses tanto pela via das pentoses-fosfato como pela via glicolítica, o que justifica a utilização de diferentes substratos no cultivo. Por meio da via das pentoses-fosfato, os açúcares e o gluconato são convertidos em glicose-6P, que é isomerizado a glicose-1P pela fosfoglicomutase, que condensa à UDP-glicose, o substrato usado pela CeSa, Celulose Sintase, para a biossíntese da celulose. O fluxo de carbono por hexoses-fosfato é regulado por uma das duas glicose-6-fosfato desidrogenases, operantes na bactéria, que é inibida por adenosina trifosfato (ATP) (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

Figura 2 - Via de biossíntese da celulose bacteriana evidenciando a celulase sintase



O processo de síntese envolve estágios como a polimerização de monômeros de glicose em cadeias lineares de β -1,4-glucana, através de transportadores indicados na transmembrana, em cadeias lineares de nanofibrilas de celulose. As cadeias são sintetizadas individualmente pelas celulose-sintases dispostas entre as membranas internas e externas. As fibrilas são excretadas primeiro de forma linear, seguida de uma ordenação paralela, onde é observada a formação de redes nanoestruturadas (HU *et al.*, 2014; ENDLER; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ; PERSSON, 2010).

3.2.2 Aplicação da celulose bacteriana no campo biomédico

Por se tratar de um material biocompatível de alta cristalinidade, hidrofiliabilidade, flexibilidade e resistência mecânica com uma nanoestrutura porosa, a aplicação de membranas de celulose bacteriana no campo biomédico é amplamente estudada, como apresentado na Tabela 1, uma vez que sua estrutura fibrilar se assemelha a matriz extracelular da pele, auxiliando nos mecanismos de cicatrização e regeneração teciduais (RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015).

A membrana de celulose bacteriana quando aplicada proporciona o crescimento de vasos sanguíneos, assim como a formação da derme e epiderme, através da regulação da quantidade expressa de colágeno. Por se tratar de um material transparente, permite o acompanhamento do processo de cicatrização se utilizado como biocurativo, além de possuir a capacidade de se associar parcialmente aos tecidos formados (CACICEDO *et al.*, 2016; PICHETH *et al.*, 2017).

Tabela 1 - Aplicações da celulose bacteriana na área biomédica

Aplicações na área biomédica	Referências
Regeneração e cicatrização de queimaduras e feridas crônicas	(KWAK <i>et al.</i> , 2015)
Associação a tecidos e vasos sanguíneos	(SCHERNER <i>et al.</i> , 2014)
Sistema de liberação de fármacos	(ULLAH <i>et al.</i> , 2019)
Pele artificial ou <i>scaffolds</i> para engenharia de tecidos	(GORGIEVA, 2020)
Implantes	(MAUTNER, 2020)

Fonte: Próprio autor.

As propriedades da celulose podem ser moduladas por modificações físicas ou químicas. A grande quantidade de grupos hidroxila nas glicoses anidras que constituem a celulose são grupos reativos específicos que podem se ligar a compostos capazes de emprestar novas características a esse biopolímero. A pluralidade deste material como matriz polimérica é o que instiga grupos de pesquisa de todo o mundo a promover tentativas para conjugar diferentes moléculas à celulose bacteriana (FARIA-TISCHER, RIBEIRO-VIANA, TISCHER, 2019). A interação entre a celulose com outros polímeros pode ser alcançada por processos físico-químicos como também durante a biossíntese, como é obtido para misturas com o ácido hialurônico (DE OLIVEIRA et al., 2017).

3.3 Goma Ácidas

3.3.1 Goma Karaya

A goma karaya é produzida por plantas superiores do gênero *Sterculia* como forma de defesa após uma agressão, servem para vedar o corte e evitar a desidratação. Depois de extraída e tratada possui aparência fina como poeira, apresenta cor pálida, além de sabor e aroma levemente acético. Devido a presença de grupos acetil, ela pode aumentar de 60 a 100 vezes o seu volume original em água fria. Por outro lado, em suspensão com água, apresenta características de viscosidade estáveis e de natureza não redutora (DHIMAN; SINGH; SHARMA, 2019; LÓPEZ-FRANCO *et al.*, 2009).

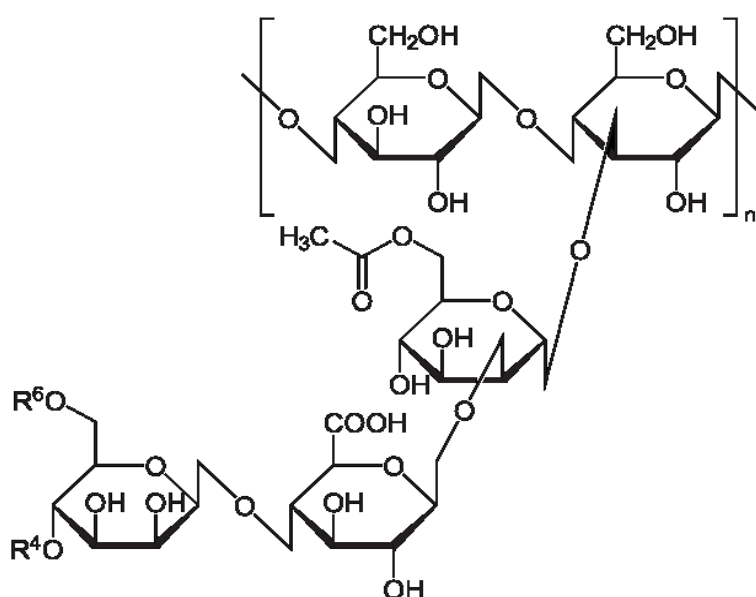
Quanto à sua disposição espacial, a goma karaya apresenta uma estrutura altamente ramificada, justificando sua elevada massa molecular (aproximadamente 16×10^6 Dalton). Formada por unidades conhecidas como glicanoramno-galacto-uritano, sua cadeia principal é formada por ligações α -1,2 e α -1,4 entre unidades de L-ramnopiranosose e ácido D-galacturônico (Figura 3). As cadeias laterais têm ligações 1, 2 de β -D-galactose ou ligações 1,3 de ácido β -D-glucurônico ao ácido galacturônico da cadeia principal, e os resíduos de ramnose da cadeia principal são ligados através de ligações β -1,4 com unidades de galactose (MIKUŠ; VALÍK; DODOK, 2011)

3.3.2 Goma Xantana

A goma xantana (GX) é um biopolímero microbiano produzido por *Xanthomonas* spp. de maneira extracelular durante a fermentação aeróbica. De acordo com a cepa microbiana utilizada, é possível atenuar ou intensificar propriedades da goma xantana, que envolvem a capacidade de produzir géis, dispersantes e soluções ou misturas viscosas. O seu diferencial perante outras gomas solúveis em água está em sua interação com o solvente, que pode promover estabilidade em meios ácidos bem como a manutenção das características deste heteropolissacarídeo mesmo após congelamento e descongelamento, bem como reações de síntese (FARHADI; KHOSRAVI-DARANI; NEJAD, 2012; KUMAR; RAO; HAN, 2018).

A estrutura da goma xantana apresenta unidades repetidas de pentassacarídeos, numa composição que segue glicose, manose e ácido glucurônico numa proporção igual a 2: 2: 1. A cadeia principal da goma xantana é formada por unidades de glicose através de ligações α ou β 1,4-glicosídicas e a cadeia lateral da unidade de trissacarídeos contém sucessivamente manose, ácido glucurônico e manose, como apresentado na Figura 5. A massa molecular da goma xantana pode variar de acordo com as cepas e condições de fermentação, mas está estimada entre $2,0 \times 10^6$ e $5,0 \times 10^7$ (GARCÍA-OCHOA et al., 2000)

Figura 5 - Estrutura da goma xantana



Fonte: Elaborado pelo autor.

A goma xantana foi autorizada pela FDA para aplicação como aditivo alimentar sem nenhuma restrição, já que sua pseudoplasticidade, pode produzir uma solução espessante, adequada para muitos alimentos. Sua demanda e produção industrial vêm aumentando progressivamente, a uma taxa anual de 5 a 10%, desde o início do século. Estima-se que 30000 T dessa goma sejam produzidas por ano (LI et al., 2016).

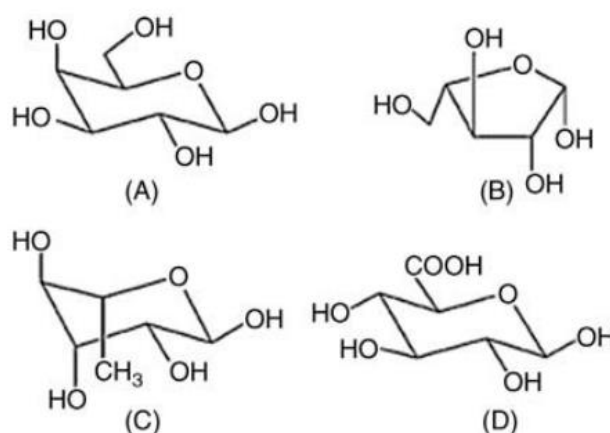
Além de sua capacidade de espessamento, dispersão, emulsificação e suspensão, a goma xantana também é estável em meios ácidos e básicos, bem como resistente a sais e temperatura. Isso ocorre, devido a ampla variedade de espécies do gênero *Xanthomonas* produzirem diferentes grupos acis em suas estruturas, possibilitando a formação de complexos, aumentando assim a relevância da utilização deste biopolímero em indústrias de alimentos, recuperação de petróleo, farmacêutica, cosmética, têxtil e outras (LEE et al., 2019).

3.3.3 Goma Arábica

A goma arábica (GA) obteve atenção nas mais diferentes frentes devido à baixa toxicidade, biocompatibilidade com os metais e fácil disponibilidade, tendo também o custo-benefício como uma característica chave para a utilização deste biopolímero em diversas formulações da indústria alimentícia. Sendo um polissacarídeo complexo derivado do exsudato natural da *Senegalia senegal* ou da árvore Acácia senegal, a goma arábica vem apresentando aplicações alternativas à química de carboidratos, uma delas se dá pela associação com alginato, onde é possível desenvolver um material para transporte direcionado de proteínas e bioativos (ATGIÉ et al., 2019).

Dependendo de sua variedade, suas frações incluem aproximadamente, 1–3% de proteína e 90–95 % de carboidrato, sendo os principais aminoácidos presentes a hidroxiprolina, serina, ácido aspártico, treonina e prolina. A rede polimérica pode ser envolta por misturas de sais de cálcio, magnésio e potássio. Sua estrutura compreende unidades de galactopiranosil β -D formando ligações peptídicas β -1,3. As cadeias laterais são feitas de duas a cinco unidades β -D-galactopiranosil ligadas a 1,3, unidas à cadeia primária por ligações 1,6. Tanto a cadeia principal quanto as cadeias laterais possuem alguns constituintes (Figura 6) como unidades β -L-arabinofuranosil e β -L-ramnopiranosil, sendo comum também encontrar unidades de β -D-glucuronopiranosil e 4-Ometil- β -D-glucuronopiranosil em sítios terminais. (GASHUA et al., 2015; MARIOD, 2018)

Figura 6 - Principais constituintes da cadeia polimérica da goma arábica.



Fonte: MARIOD, 2018. (A) D-galactopiranosose, (B) L-arabinofuranose, (C) L-ramnopiranosose e (D) Ácido d-glucopiranosurônico.

Na medicina popular, foi relatado que a GA pode ser usada para tratamentos inflamatórios da mucosa intestinal e para cobrir superfícies e apesar de ser considerada uma substância "inerte", é possível encontrar diversos grupos de pesquisa que estudam este polissacarídeo para além da ciência de alimentos, como a utilização da goma em pacientes com insuficiência renal crônica onde foi possível reduzir as concentrações plasmáticas de ureia e creatinina substituindo a necessidade de diálise de 3 para 2 vezes por semana (ALI; ZIADA; BLUNDEN, 2009).

3.4 Aminoácidos e proteínas associados a matrizes poliméricas

A maioria dos estudos envolvendo a inserção de proteínas e aminoácidos em compostos poliméricos está relacionados a família do colágeno. Isto porque os colágenos são o principal constituinte de tecidos conjuntivos e intersticial, e são elementos estruturais de praticamente todos os órgãos parenquimatosos, onde contribuem para sua integridade esquelética. O colágeno fornece força e estabilidade estrutural aos tecidos do corpo, incluindo pele, vasos sanguíneos, tendões, cartilagens e ossos (DONG; LV, 2016).

Um fator predominante para modificações estruturais, interferindo no comportamento celular, é que a proteína de interesse permaneça disponível na superfície da cadeia modificada, uma vez que células se aderem a proteínas através de receptores da membrana celular. O colágeno exógeno promoveu excelente adesão e migração em trabalho publicado por Brown (2013), pois permitiu que células secretassem suas próprias

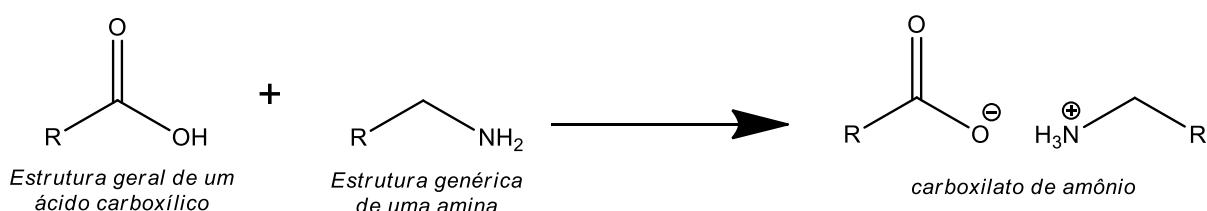
moléculas da matriz, por exemplo, fibronectina, que desempenhou papel importante na regulação e adesão desse material (BROWN, 2013)

A funcionalização da celulose pode ser obtida através da introdução de grupos carboxilato ou amino, ou seja a incorporação de grupos ligantes a sua estrutura afim de apresentar um novo biomaterial, como já foi proposto por Ribeiro-Viana e colaboradores (RIBEIRO-VIANA; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2016b) que produziram membranas de celulose succiniladas que serviram de matriz para funcionalização com colágeno hidrolisado utilizando técnicas usuais para a formação da ligação amida.

3.4.1 Reações de substituição a carbonila – ligação amida (mecanismo)

Os ácidos carboxílicos não reagem espontaneamente com aminas para reações de substituição a carbonila, pois a basicidade das aminas acaba por desprotonar o ácido, levando ao íon carboxilato, que viria a promover um péssimo grupo abandonador. A ocorrência dessa reação não é vista nem entre os ácidos mais fortes, pois poderia ocorrer a protonação da amina, conseqüentemente a inativando como nucleófilo (HO et al., 1995).

Figura 7 – Reação geral de um ácido carboxílico com amina.

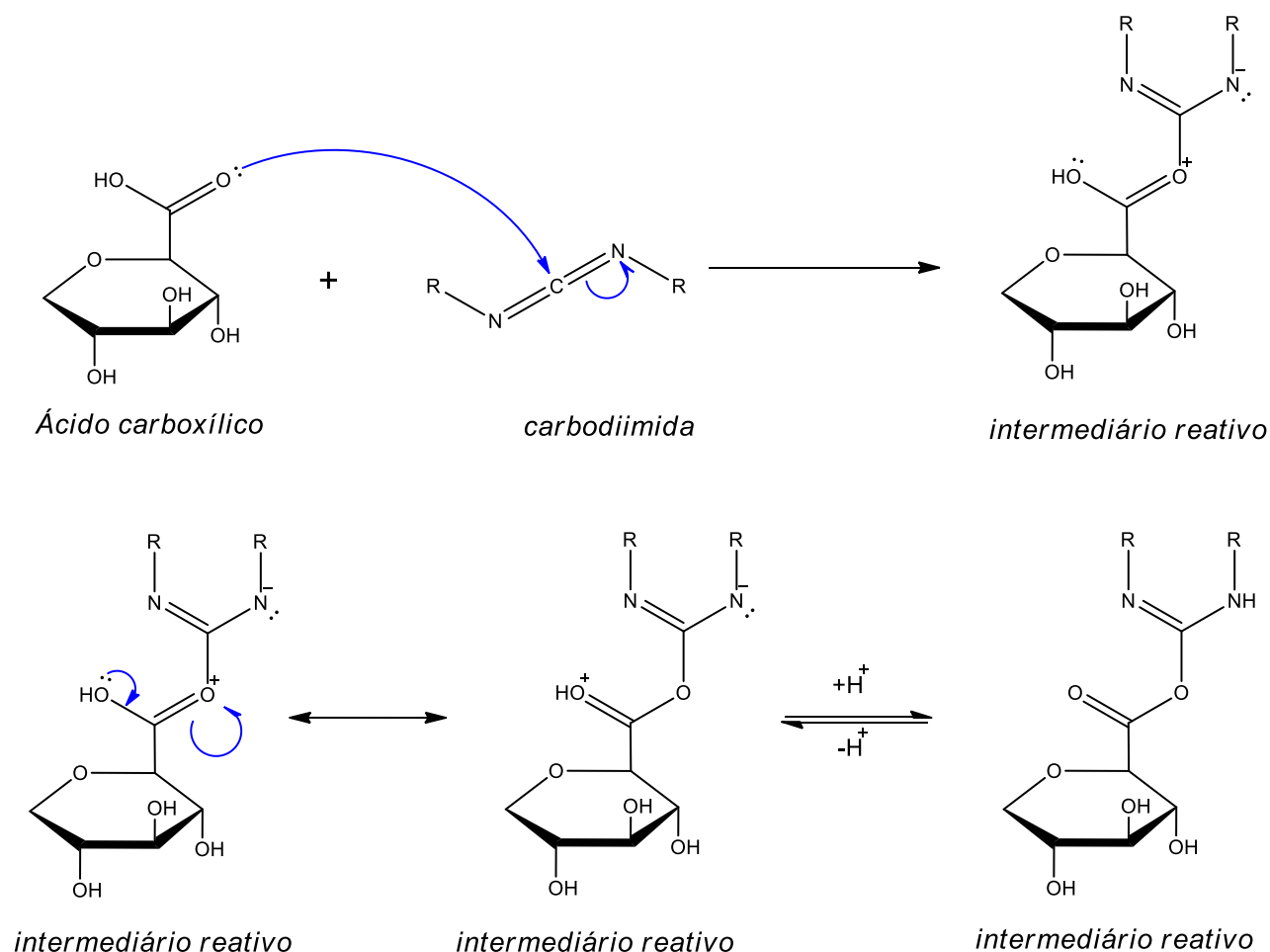


Fonte: Próprio autor, adaptado de Ho e colaboradores, 1995.

A modificação estrutural também pode ocorrer utilizando um reagente carbodiimida, como o EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) ou DCC (N-N'-diciclohexilcarbodiimida) que atua como agente de reticulação mediando a formação de ligações de agrupamento éster entre hidroxilas e carboxilas e ligações amida entre aminas e oxigênios reativos. Sua vantagem perante a outras metodologias empregadas em reações de substituição está em produzirem subprodutos derivados da uréia, que são excelentes grupo abandonadores, apresentam baixa citotoxicidade e são solúveis em água. (FROIDEVAUX et al., 2016).

O mecanismo se inicia com o ataque do oxigênio da carbonila do ácido carboxílico ao carbono no centro eletrofílico da carbodiimida, formando um éster intermediário que, após deslocalizações eletrônicas por ressonância e transferência de prótons, fornecem um intermediário reativo, como observado na Figura 8.

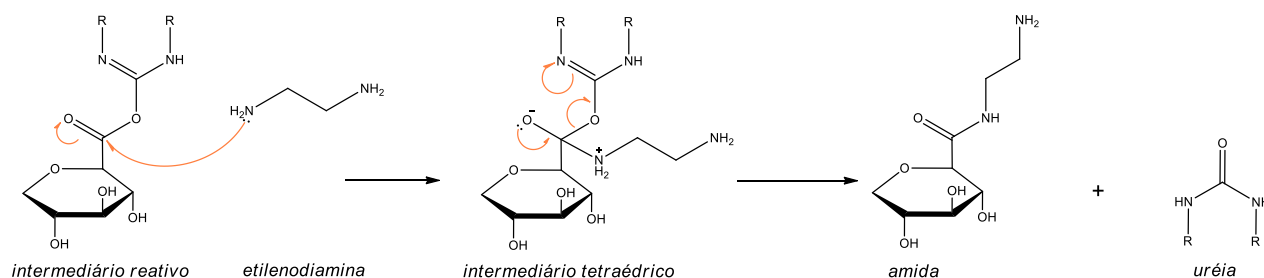
Figura 8 - Mecanismo envolvendo um ácido carboxílico e o agente carbodiimida para a formação de um intermediário reativo.



Fonte: Próprio autor, adaptado de HO e colaboradores, 1995.

O intermediário dessa síntese ao ser submetido a reações com aminas, permite a formação de ligações amida, uma vez que ocorre a liberação de um bom grupo abandonador, que deve ser uma base fraca ou possuir algumas características como ser altamente eletronegativo e se estabilizar por ressonância (HO et al., 1995). É de extrema importância que a ordem de adição, tal como a formação do intermediário reativo, intermediário tetraédrico e uréia estejam presentes ao longo da síntese, para que de fato haja a formação da ligação amida, como demonstrado na Figura 9.

Figura 9 – Mecanismo envolvendo o intermediário reativo e uma amina (etilenodiamina) tendo como produto uma amida e o subproduto uréia.



Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de SOLOMONS, 2011.

Uma das vantagens de se utilizar a carbodiimida é que o intermediário dessa reação não precisa ser isolado e todas as etapas podem ocorrer em temperatura ambiente, além disso, amidas produzidas a partir de reações com carbodiimida possuem alto rendimento. Sua principal desvantagem está relacionada ao preço, visto que os reagentes carbodiimidas apresentam um alto valor agregado. (HO et al., 1995; NAKAJIMA; IKADA, 1995).

3.5 Nanopartículas de prata associadas a aminoácidos

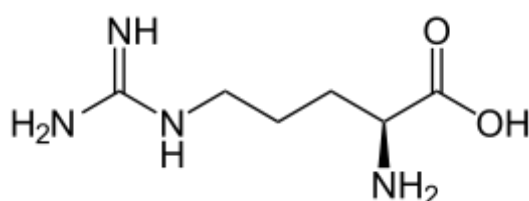
A associação entre nanopartículas metálicas e aminoácidos apresenta profundo interesse devido a propriedades antimicrobianas alcançadas pela nanopartícula metálica e pela variedade de síntese e conjugação possível entre os dois compostos. As reações entre o aminoácido (ou alguma outra biomolécula) e os íons Ag^+ para conversão a Ag^0 acontecem de modo a promover a biorredução. Diversos aminoácidos podem ser utilizados como glicina, cisteína, leucina, aspartato, lisina, arginina, assim como demais biomoléculas que apresentarem potencial redutor (WANG et al., 2009). Em geral, a obtenção de nanopartículas de prata (AgNP) ocorre por uma síntese de oxirredução na qual agentes redutores e oxidantes agem de modo a formar colóides e prata provenientes da redução da prata em um estágio de nucleação, sendo que a formação da prata metálica pode ser controlado pelos parâmetros de reação, que vão desde as concentrações dos agentes, como temperatura, vazão e pH. (LEGLER et al., 2001)

Em geral, a afinidade entre a prata e um aminoácido depende diretamente da interação do íon Ag^+ com sua cadeia lateral. Essa interação é ditada principalmente por dois fatores, o impedimento estérico presente da estrutura do aminoácido e de sua força como uma base de Lewis para complexar a prata. O esqueleto carbônico do

aminoácido estabiliza indutivamente as cargas positivas presentes da estrutura resultando no aumento da afinidade da prata entre as ligações (YOUSAF et al., 2015).

A arginina é o precursor de muitos compostos essenciais para o organismo. Além de estar diretamente relacionada com rotas metabólicas de proteínas, óxido nítrico, prolina, creatina, agmatina e poliamina e estimular a secreção de hormônios como insulina, glucagon, hormônio do crescimento e prolactina, este importante aminoácido se destaca pela estrutura sugestivamente reativa (Figura 10), e alta disponibilidade para reações. (DANIELAK, 2019)

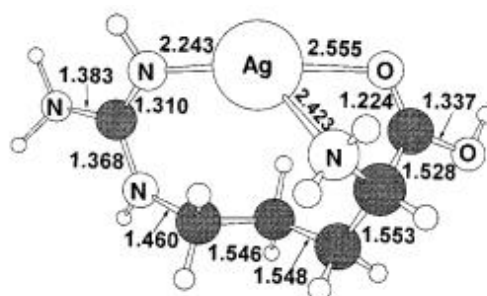
Figura 10 - Estrutura da arginina



Fonte: Elaborado pelo autor.

Por possuir uma estrutura tricoordenada, ao ser complexada com o íon prata, interage com seu nitrogênio terminal, o oxigênio da carboxila, e com o outro nitrogênio presente na estrutura, como foi proposto por Shoeib e colaboradores e demonstrado na Figura 11 abaixo.

Figura 11 - Complexação da arginina com a prata e os valores de comprimento de ligação em ângstrons.



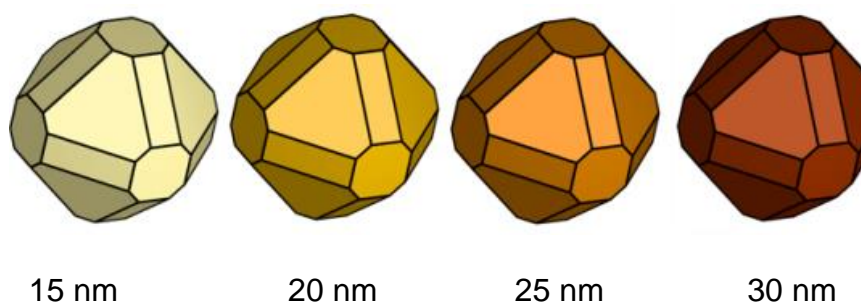
Arginine

Fonte: SHOEIB, SIU e HOPKINSON, 2002.

Muitas morfologias podem ser encontradas para as AgNPs, que apresentam formas como tetraedro, octaedro, cuboctaedro, dodecaedro rômbo truncado, entre outros. A coloração da solução de nanopartículas está diretamente

relacionada ao seu tamanho, pelas diferentes formas de se ligarem. As estruturas apresentam modos vibracionais diferentes no espectro Uv-Vis, por fenômenos diversos como excitação coletiva de elétrons livres, transição entre bandas e dispersão da superfície, que ocasiona na variação do tamanho da nanopartícula entre 1-30 nm. Portanto a metodologia empregada é fundamental para a obtenção de nanopartículas do tamanho desejado, que estará diretamente relacionado a sua coloração, apresentado pela Figura 12 e a Tabela 2.

Figura 12 - Variação de cor relacionado com o tamanho e forma da AgNP.



(variação de ~3nm de acordo com o tom da nanopartícula)

Fonte: (BARNARD, 2014)

Tabela 2 - Relação entre o comprimento de onda e o tamanho da nanopartícula

Comprimento de onda (nm)	Tamanho da partícula (nm)
380-390	5-10
395-405	10-14
420-435	35-50
438-450	60-80

Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de DURÁN et al., 2019.

Quando comparada a outras nanopartículas como ferro e zinco, a prata se destaca principalmente pela capacidade de complexação, propriedades condutivas, hidrofóbicas e antimicrobianas, bem como a blindagem contra interferências eletromagnéticas. Frente a nanopartículas de metais como mercúrio e cádmio se acentua como uma opção de grande atividade bactericida com menor toxicidade (JAFARI et al., 2016; SHOEIB et al., 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos e reagentes

Os experimentos foram realizados com o apoio financeiro de CAPES com o aporte de recursos do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do CNPq Universal Processo: 479992/2013-4, e do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (DBBTEC) da Universidade Estadual de Londrina. Foram usados os equipamentos nos laboratórios do DBBTEC como balança analítica, fluxo laminar, centrífugas, estufas BOD entre outros. Os reagentes Goma Karaya – From Sterculia Tree, Goma Arábica, N-Hidroxisuccinimida (NHS) e EDC são da SIGMA-ALDRICH e a Goma Xantana de origem alimentícia.

4.2 Produção da celulose bacteriana

4.2.1 Microorganismo, estoque e meio de cultura

A cepa utilizada para a produção das membranas de celulose bacteriana deste estudo foi a *Komagataeibacter xylinum* ATCC 23769 cedidas pelo Laboratório de Análise de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, que foram mantidas em microtubos em meio HS com glicerol 30 % a -80°C.

O meio utilizado para a produção foi o descrito por Hestrin-Schramm's (HS) e adaptado de Goelzer e colaboradores, 2009 que está descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Formulação adaptada do meio HS para a produção de celulose bacteriana.

Substância	Quantidade
Glicose	30 g
Peptona	5 g
Extrato de Levedura	5 g
Na ₂ HPO ₄	5 g
Ácido Cítrico	1,15 g
H ₂ O	1 L

Fonte: Adaptado de Goelzer e colaboradores (2009).

4.2.2 Processo de produção de membranas de celulose bacteriana e adição de gomas ácidas

Para a etapa do pré-inóculo, o microorganismo, com concentração de 5 % (m/m), foi transferido, em câmara de fluxo laminar, para um erlenmeyer contendo 40 mL de meio HS, que foram submetidos à agitação por 110 rpm a 28°C por 48 horas.

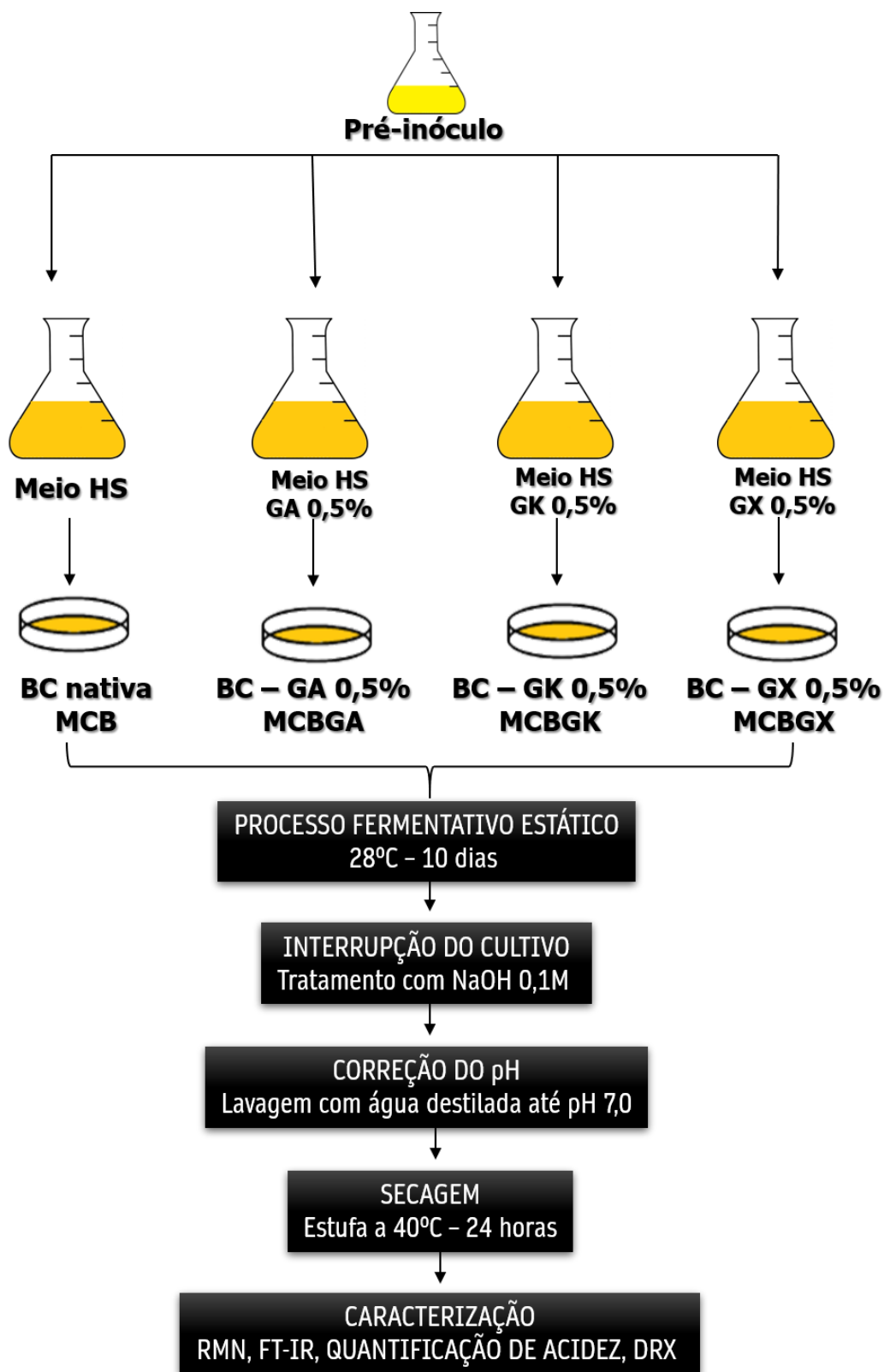
Após as 48 horas, as células em suspensão foram transferidas para um erlenmeyer contendo 360 mL de meio HS e após homogeneização, foram transferidos a bandejas de volume de 500 mL. Os compostos poliméricos celulose-goma foram obtidos pela adição de gomas ácidas à formulação do meio.

A produção de celulose bacteriana, tanto a membrana controle quanto os compostos celulose-gomas, foram condicionadas estaticamente em estufa BOD por 10 dias a 28°C. Após dez dias de fermentação, as membranas foram removidas da cultura estática e purificadas. Os filmes foram imersos em NaOH 0,1M por 24 horas, seguido de banho maria à 80°C, até obtenção de um material translúcido. Após a obtenção de um material limpo, as membranas foram lavadas abundantemente em água destilada até sua neutralização total e secas em estufa a 40°C e para as análises de caracterização.

Após as análises de caracterização, avaliou-se os sítios ativos das gomas para reação de conjugação com arginina para a incorporação de nanopartículas de prata. A membrana de celulose bacteriana nativa foi nominada MCB e os associados com goma arábica, karaya e xantana de MCBGA, MCBGK e MCBGX, respectivamente.

Um esquema representativo do Processo de produção de membranas de celulose nativa e dos compostos celulose-goma, está apresentado na Figura 13.

Figura 13 – Processo de produção de membranas de celulose nativa e dos compostos celulose-goma.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Funcionalização das gomas ácidas com compostos aminados

Em um balão foram adicionados 500 mg de goma e 5 mL de água, que forma submetidos a agitação moderada à 35°C por 30 minutos até completa homogeneização. Em seguida, foram adicionados 60 mg de EDC e 50 mg de NHS. A agitação e aquecimento foram mantidos nos mesmos parâmetros por 1 hora. Posteriormente foram adicionados mais 10 mL de água e 500 mg de composto aminado, neste trabalho a arginina. A reação ocorreu à 45°C por 24 horas.

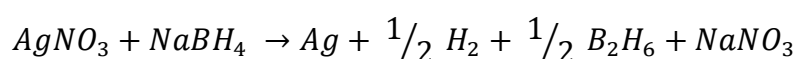
Após 24 horas, o material foi lavado abundantemente com etanol gelado e centrifugado. Em seguida os materiais foram submetidos a diálise por 48h com troca de água a cada 12 h. Posteriormente o material foi transferido da película de diálise para uma estufa à 60°C por 24 h e seguiu para a liofilização. Após o procedimento, o material seco seguiu para as análises de caracterização.

4.4 Incorporação de nanopartículas de prata no produto da funcionalização

A produção de AgNP para incorporação foi realizada com 0,200 g do produto obtido da funcionalização com arginina (GKEDCARG) dispersos em 20 mL de água destilada em um erlenmeyer de 100 mL. Em seguida, foram adicionados 0,004 g de hidróxido de potássio (KOH). O sistema foi colocado em resfriamento e agitação magnética constante. Uma solução de nitrato de prata (AgNO_3) 1,15mM, foi gotejada no erlenmeyer contendo GKEDCARG com o auxílio de injetor automático a uma taxa de 10 mL/h até atingir 8,5 mL, onde observou-se intensa mudança na coloração. Em seguida o material foi separado para leitura no Espectrofotômetro Uv-Vis e antibiograma.

4.5 Produção de nanopartículas de prata pelo método do boro hidreto.

Com o intuito de obter uma referência, foram produzidas nanopartículas de prata pelo método borohidreto, como apresentado na equação abaixo. Preparou-se uma solução de AgNO_3 5 mM que, com o auxílio de um injetor automático, foi gotejada sobre uma solução de 100 mL de borohidreto de sódio (NaBH_4) 10 mM a uma taxa de 10 mL/h até completar o volume de 5 mL. A adição ocorreu sob agitação moderada a 5 °C. em seguida, o material foi colocado em frasco de vidro âmbar e condicionado em câmara fria. A reação para a formação de AgNP está representada abaixo.



4.6 Métodos físico e químicos e caracterização

4.6.1 Quantificação da acidez dos filmes formados

Os filmes de celulose obtidos no item 4.2.2 foram submetidos a uma quantificação de acidez por titulação. As membranas foram dispostas em um Becker e submergidos em uma solução de HCl 0,1M e com uma pipeta automática titulou-se sequencialmente 5 mL NaOH, ação se repetiu até atingir o limite de 60 mL. O valor de pH foi aferido a cada dosagem utilizando um pHmetro para posterior plotagem dos gráficos para analisar a quantidade de ácido presente no composto celulose-goma. As equações abaixo foram utilizadas para o cálculo das derivadas das curvas de titulação.

Tabela 4. Equações para a primeira e segunda derivada das curvas de titulação

<i>Primeira Derivada</i>	<i>Segunda Derivada</i>
$pH' = \frac{\Delta pH}{\Delta v} = \frac{pH_f - pH_i}{v_f - v_i}$	$pH'' = \frac{\Delta^2 pH}{\Delta^2 v} = \frac{\Delta \left(\frac{\Delta pH}{\Delta v} \right)}{\Delta v}$

4.6.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

As análises de FT-IR foram realizadas tanto para os materiais de partida (gomas ácidas e celulose bacteriana nativa) como para os compostos celulose-goma e as funcionalizações com arginina. As amostras foram secas em estufas à 70°C por 24h e após a secagem foram trituradas e comprimidas por meio de uma prensa hidráulica, para formar pastilhas com KBr. As leituras foram realizadas em transmitância com uma resolução de 1 cm⁻¹ no intervalo de 4000 a 400 cm⁻¹ no espectrofotômetro de infravermelho da marca Shimadzu, modelo IR PRESTIGE-21 do Laboratório de Espectroscopia da Central Multiusuária de Laboratórios de pesquisa da UEL.

4.6.3 Análise Térmica por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

Para análise térmica, escolheu-se a análise por DSC de fluxo de calor em um equipamento da marca Shimadzu, modelo DSC-60 disponível no Laboratório de Espectroscopia da Central Multiusuária de Laboratórios de pesquisa da UEL. A técnica foi realizada tanto para os materiais de partida (gomas ácidas e celulose bacteriana nativa) como para os compostos celulose-goma e as funcionalizações com arginina. Os

parâmetros escolhidos foram baseados em análises feitas previamente com outros biomateriais, no qual o aquecimento é fornecido a partir da temperatura ambiente à 400°C, numa taxa de 10°C/minuto em atmosfera de nitrogênio. N₂

4.6.4 Difração de Raios-X (DRX)

Para análise de difração de raios-X θ - 2θ foi empregado o difratômetro Panalytical X' Pert PRO MPD do Laboratório de Análises por Raios-X da Central Multiusuária de Laboratórios de pesquisa da UEL (LARX-UEL). O Feixe monocromático incidente de Cu (K₂) excitado a 40 Kv e 30 mA, com uma taxa de varredura de 0,002°/s, com registros de 5 a 60° (2θ). O índice de cristalinidade foi determinado pelo método de Segal, como apresentado abaixo:

Tabela 5 - Determinação do índice de cristalinidade pelo método de Segal.

$$IC (\%) = \left(\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) X 100$$

I_{am} = intensidade do halo amorfo em $\sim 18^\circ$ (2θ)

I_{002} = intensidade do pico de difração 002 da celulose

Fonte: (NAM et al., 2016)

4.6.5 Espectroscopia UV-Vis

Realizou-se a leitura da suspensão em Uv-Vis no aparelho Jenway UV/VISIBLE 6715 na faixa de 200-600 nm para polímero conjugado com o aminoácido no qual fora incorporado as AgNP e para as nanopartículas de referência.

4.6.6 Antibiograma do material funcionalizado e associado com AgNP

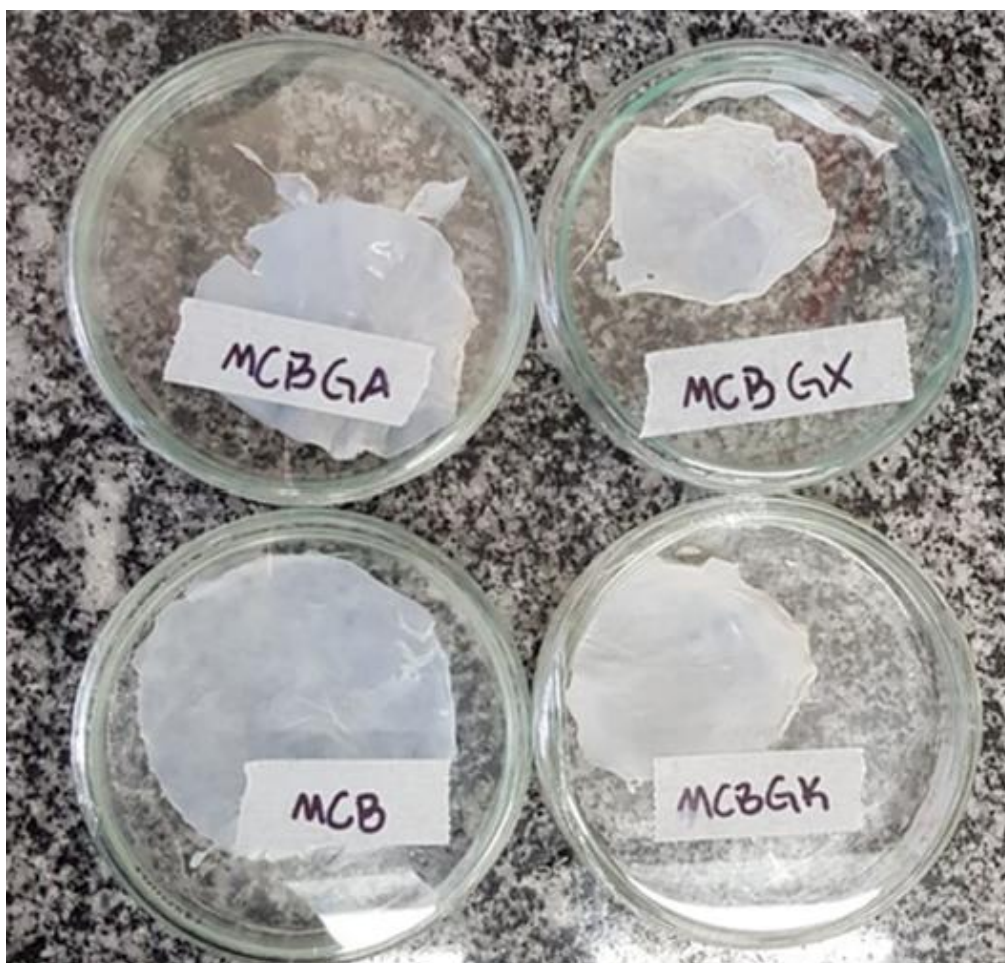
A atividade antibacteriana do material foi avaliada pelo método de difusão em disco de ágar com avaliação de zonas de inibição. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, foi crescida em meio Luria-Bertani (LB) a 37°C e 200 rpm por 24 horas. Posteriormente, sob a superfície do meio Mueller-Hinton ágar, foram transferidos cerca de 200 uL do cultivo seguido de dois discos de aproximadamente 10 mm de diâmetro referentes ao material de partida (goma karaya) e o glicoconjugado (goma-arginina-AgNP), o material foi incubado a 37°C por 24 horas, para posterior avaliação dos halos formados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico, optou-se por apresentar os mecanismos envolvidos durante o processo de síntese do produto, seguido de uma análise comparativa entre o material de partida (gomas e produto celulose-goma) e do polímero associado com arginina. Após evidências que assegurem a inserção do aminoácido ao polímero, realizou-se a caracterização da nanopartícula, de modo a assegurar a efetividade das conjugações propostas ao longo do trabalho.

As membranas produzidas tiveram a aparência translúcida e mantiveram, mesmo após os tratamentos aplicados, resistência mecânica e aspectos inerentes ao material como visto na Figura 15.

Figura 14 - Membranas de celulose bacteriana nativa (MCB) e com gomadas ácidas inseridas durante o processo fermentativo MCBGA (com goma Arábica), MCBGX (goma Xantana) e MCBGK (goma Karaya).



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1 Estudo estrutural e efeitos da reação de síntese

5.1.1 Conjugação das gomas ácidas com o aminoácido arginina

Inicialmente, as gomas foram conjugadas com arginina usando a Carbodiimida (EDC) descrita no item 4.3. Esta etapa preliminar foi realizada a fim de confirmar que o grupo ácido carboxílico das mesmas é passível de reação. O resultado da funcionalização das gomas, após o processo de diálise, seguido das etapas de secagem e liofilização, forneceu a aparência representada na Figura 16.

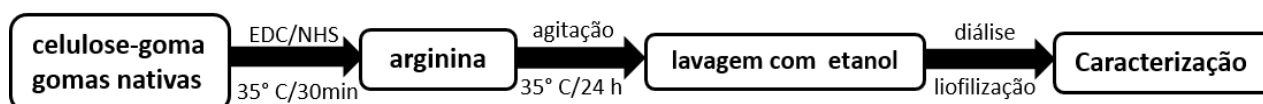
Figura 15 - Aspectos dos compostos GAEDCARG, GKEDCARG e GXEDCARG.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O procedimento se deu com amostras de GA, GK e GX nativas, onde após a reação com arginina foram nomeados GAEDCARG, GKEDCARG e GXEDCARG, respectivamente.

Figura 16. Esquema de reação dos compostos poliméricos com arginina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os grupos ácidos disponíveis nas gomas são imprescindíveis para a funcionalização com aminas, formando assim a ligação amida. Autores nas mais variadas vertentes da Química de Carboidratos, procuram a gerar carboxilas em polissacarídeos por métodos oxidativos, contudo, a adição de novos átomos de carbono a molécula pode

ocasionar em modificações espaciais do grupo reativo, o que pode facilitar ou prejudicar a inserção de novas moléculas, uma alternativa é a utilização de polímeros que possuam grupamentos ácidos disponíveis em sua estrutura, para assim partir para a síntese de glicoconjugados. (THERMO FISHER, 2012)

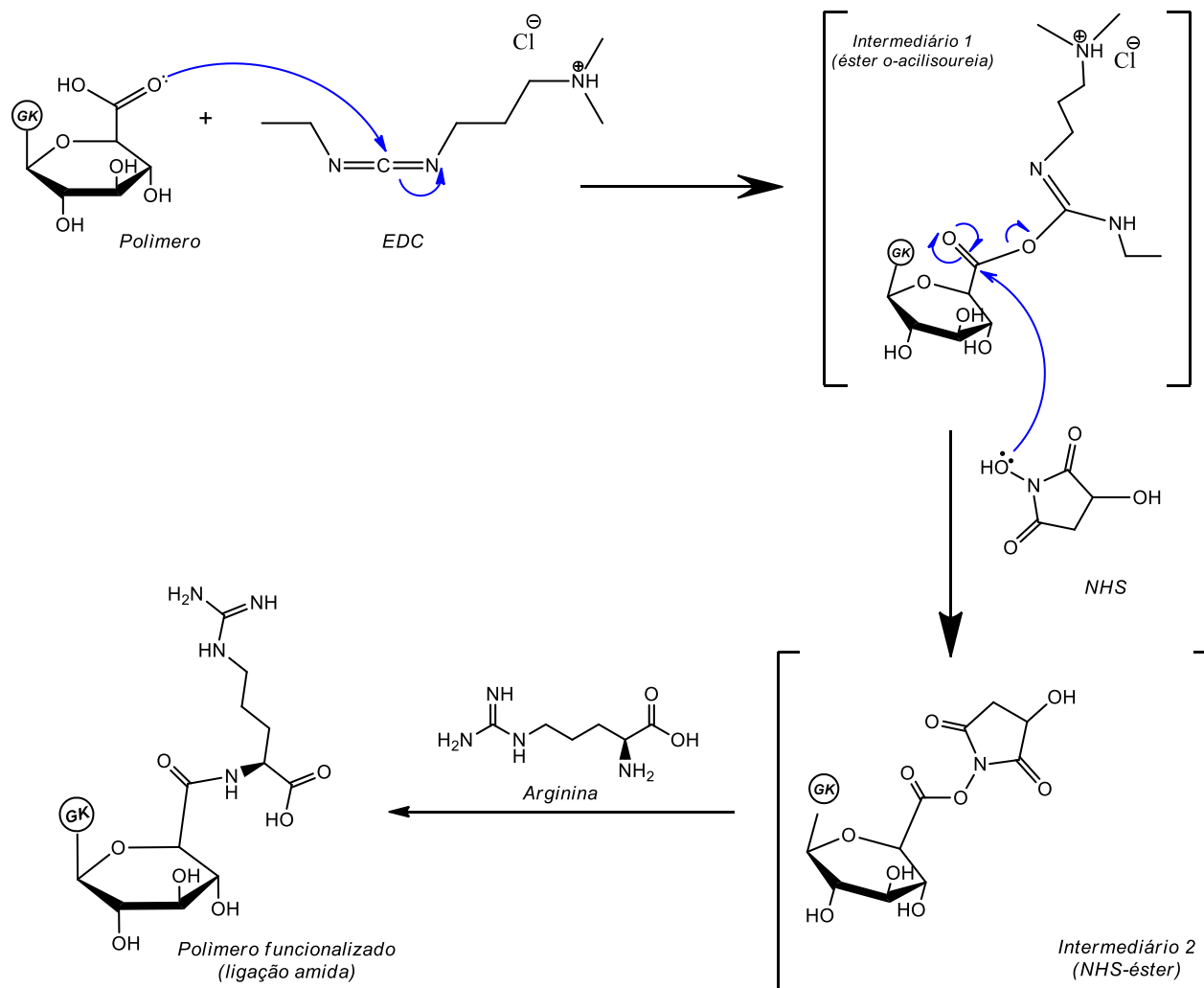
Uma das técnicas mais sofisticadas de realização de reações de bioconjugação se dá pela utilização de *crosslinkers*, que é o processo de unir, duas ou mais moléculas através de uma ligação covalente. O reagente utilizado durante a presente pesquisa, o EDC, é mais eficiente em condições ácidas e sugere-se que seja utilizado com o auxílio de um tampão MES (ácido morfolinoetanossulfônico) ou com a utilização do reagente N-hidroxisuccinimida (NHS), que ao ser incluído ao protocolo de funcionalização melhora a sua eficiência evita reações cruzadas ou deslocamento de equilíbrio. (AZARNIYA et al., 2019)

Com a premissa de utilizar os grupos ácidos disponíveis nas superfícies das gomas podemos prever o mecanismo da reação de síntese de amida que se inicia com o ataque do oxigênio da carbonila do ácido carboxílico presente no polímero ao carbono central do grupo carbodiimida, formando um primeiro éster intermediário chamado *o*-acilisourea, que após deslocalizações eletrônicas promovidas por ressonância e prototropismo, podem fornecer um intermediário reativo. O acoplamento de NHS ao EDC, forma um segundo intermediário, mais estável e reativo para reações com aminas para síntese de amidas. Então o NHS-éster reage diretamente com a arginina para a formação da ligação amida entre o polímero e o aminoácido. Uma das vantagens de se utilizar a carbodiimida junto ao NHS é que os intermediários não precisam ser isolados e, além das etapas acontecerem em temperatura ambiente e liberarem bons grupos abandonadores (uréia e grupos sulfonados), amidas produzidas a partir de reações com carbodiimida possuem alto rendimento (HO et al., 1995; NAKAJIMA; IKADA, 1995).

É necessário respeitar a ordem de adição desta reação, afim de se evitar reações intramoleculares. Logo, primeiramente adiciona-se o EDC, seguido do NHS para depois a amina de interesse, evitando assim um *crosslink* entre a própria molécula, etapa que pode ocorrer devido ao intermediário reativo que pode reagir com sítios reativos da própria extensão polimérica com a amina adicionada. Analisando o mecanismo proposto junto a metodologia utilizada, espera-se que a reação tenha ocorrido de acordo com o apresentado, tendo em vista que as condições experimentais corroboram as informações disponíveis na literatura para a produção de ligações amida.

O mecanismo proposto para a síntese está apresentado na Figura 17.

Figura 17 – Proposta de mecanismo da funcionalização dos grupos ácidos disponíveis nas gomas com arginina utilizando EDC e NHS



Fonte: Elaborado pelo autor.

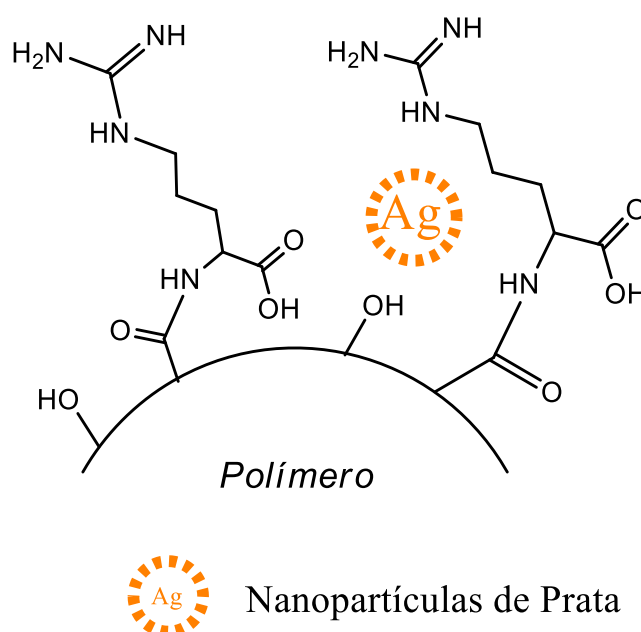
5.1.2 Formação de nanopartícula de prata na superfície polimérica

O sistema polimérico de cargas superficiais das cadeias de gomas ácidas é de extrema importância para a promoção de interações eletrostáticas e sugere a inserção de nanopartículas metálicas no sistema, uma vez que essas partículas monodispersas em sistema aquoso somadas ao impedimento estérico atenuado, elevam a natureza polianiônica da gomas a uma interessante plataforma de modificação química,

mantendo suas propriedades naturais e atribuindo novas características e esse biomaterial (CHAWLA et al., 2020).

O modelo demonstrado na Figura 18, foi baseado na interação de aminoácidos com a prata, onde a arginina inserida ao biopolímero apresenta ligações que complexam o íon prata através dos pólos eletronegativos presentes ao longo da estrutura interagindo com grupos carbonila e hidroxila com a superfície das nanopartículas. Neste trabalho buscou-se a formação de uma rede de interação entre o aminoácido associado a matriz polimérica com a prata, desta forma obtendo um produto que possua nanopartículas metálicas aderidas quimicamente à superfície do material (ABDOLYOUSEFI et al., 2020).

Figura 18 – Proposta de interação e complexação da prata no polímero conjugado com arginina.



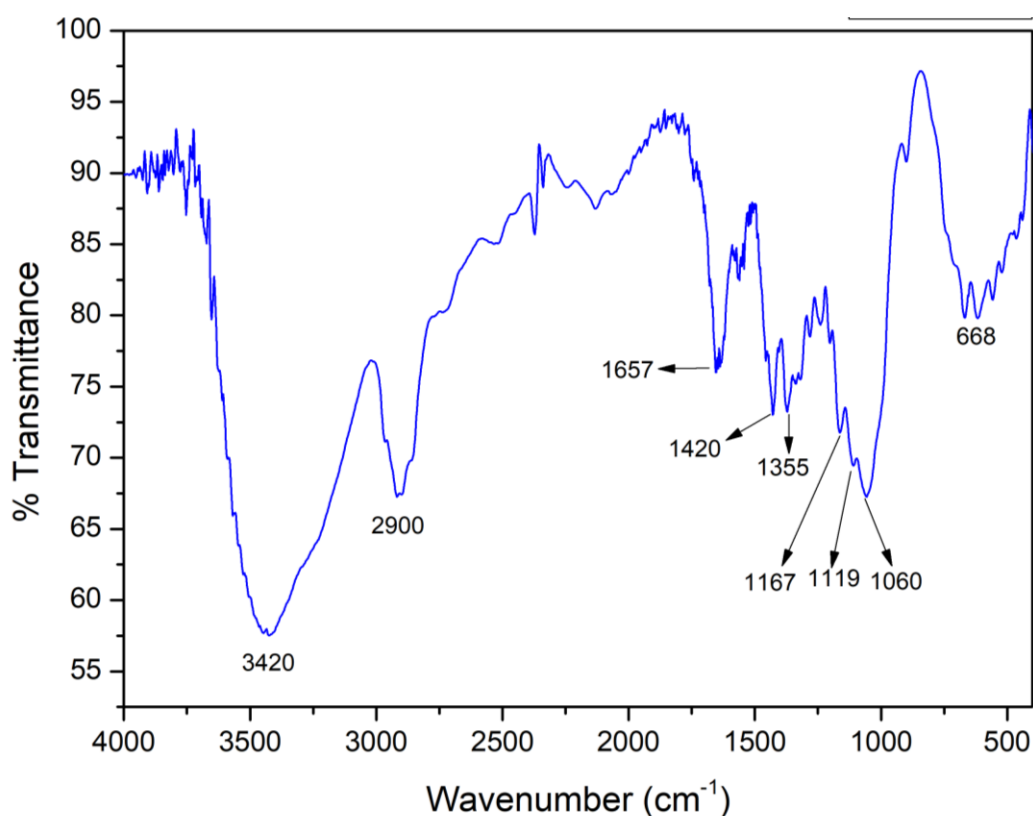
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

No espectro de FT-IR da membrana de celulose bacteriana sem gomas, mostrado na figura Figura 19, é possível identificar bandas características do biopolímero, como as presentes em 3.410 cm^{-1} e 2.900 cm^{-1} , relativas a estiramentos de grupos (-OH) e (C-H) de alcanos, respectivamente. As interações de hidrogênio e a presença de água

intermolecular pode ser indicada por bandas presentes entre 1.650 e 1.660 cm^{-1} . A banda presente em 1.420 cm^{-1} é referente às deformações ($-\text{CH}_2-$) e em 1.355 cm^{-1} às ligações C-H. A bandas em 1.167 cm^{-1} , 1.119 cm^{-1} e 1060 cm^{-1} são relativas à vibração assimétrica de (C-O-C) e flexão esquelética (C-O). Já deformações de (C-OH) podem ser identificadas pela sinalização em 668 cm^{-1} . (SZYMAŃSKA-CHARGOT; CYBULSKA; ZDUNEK, 2011)

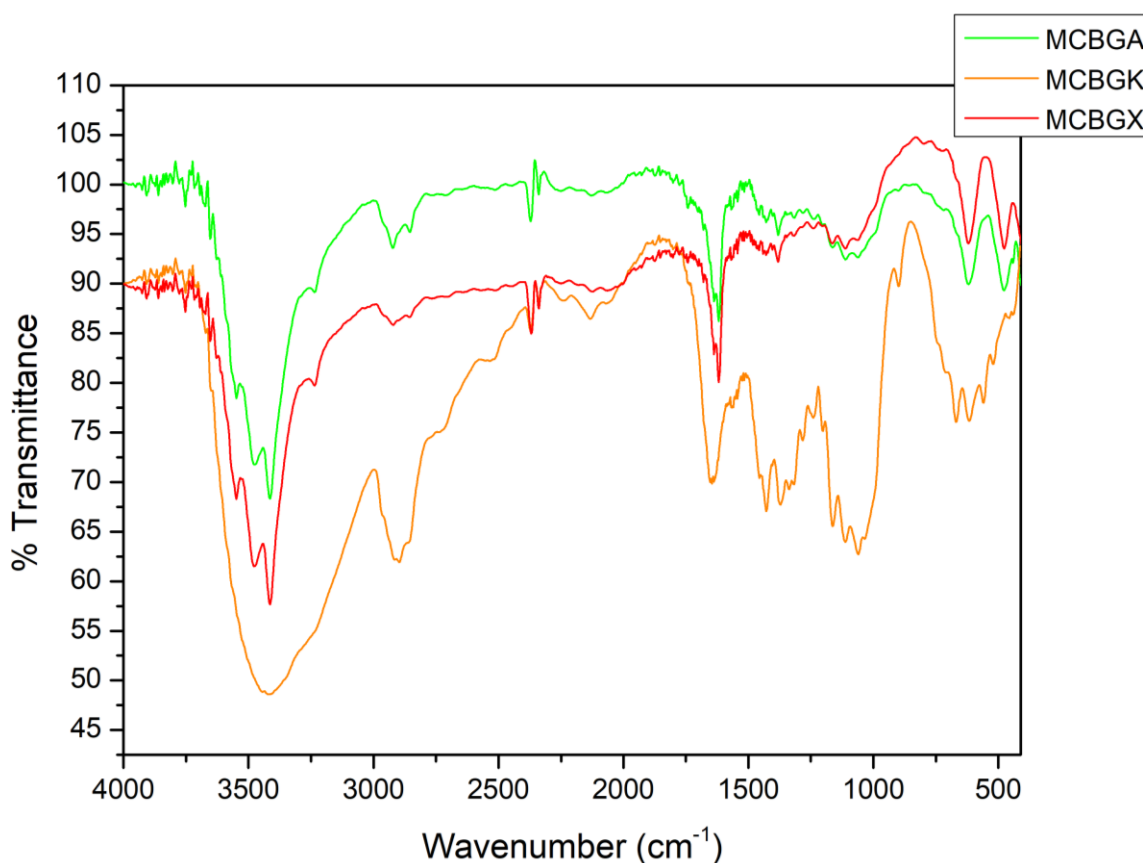
Figura 19 – Espectro de FT-IR da membrana de celulose bacteriana sem gomas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As bandas observadas na membrana de celulose sem gomas são comuns aos polissacarídeos, e estão presentes nas membranas que receberam as gomas ácidas durante o processo fermentativo, com o aparecimento esperado de bandas relativas às carboxilas de ácidos Glucurônico e Galacturônico. Os espectros de FT-IR dos filmes com goma arábica (MCBGA) e goma xantana (MCBGX) se aproximam em perfil e valores da celulose original, enquanto o material formado por celulose associado à goma karaya (MCBGK) apresenta resíduos proteicos, esperados para esta goma vegetal. Os espectros dos filmes modificados com gomas podem ser visualizados através da Figura 20.

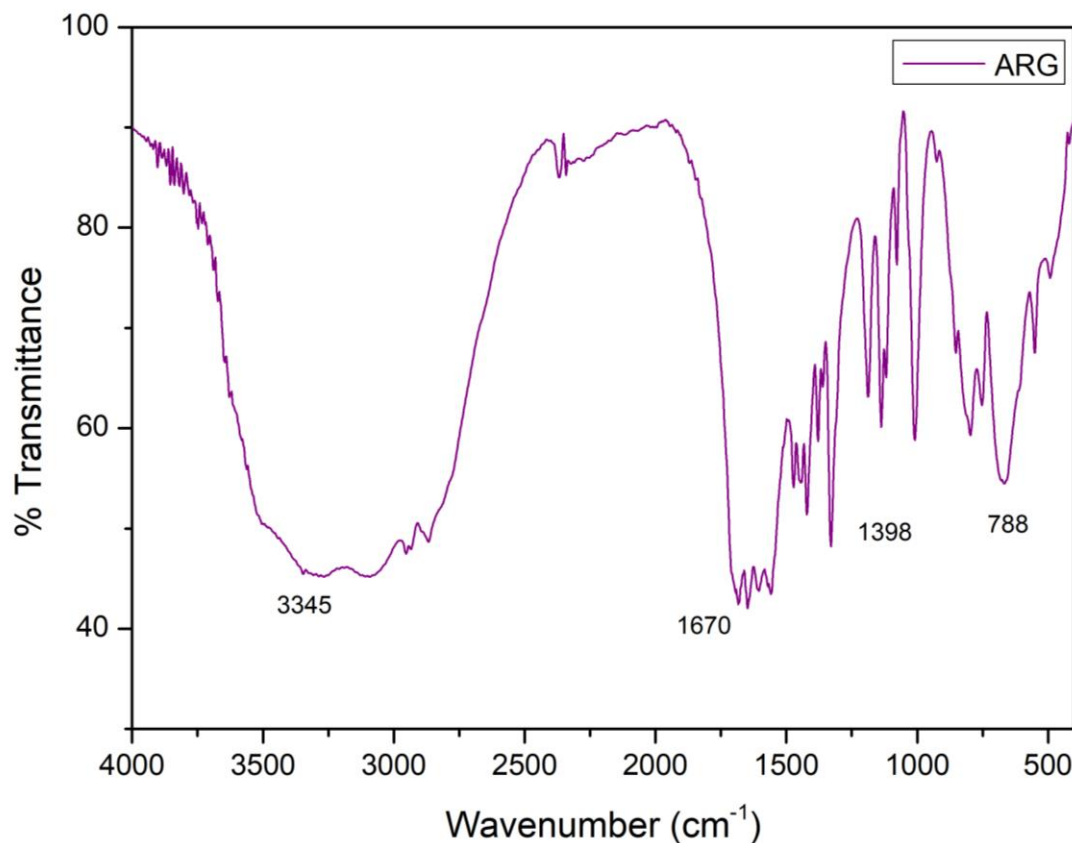
Figura 20. Espectros de FT-IR dos filmes de celulose com adição de gomas ácidas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Carbonilas de ácidos carboxílicos presentes em carboidratos, podem sofrer alterações no espectro de FT-IR quando ocorre associação entre polímeros ou processos de desprotonação. As modificações, seja por sobreposição de espectros ou rearranjos estruturais devido a diversidade de efeitos indutivos, sítios ativos e interações presentes na estrutura polimérica, sugerem que a análise de um polissacarídeo misto seja minuciosa, considerando suas características individuais e considerando técnicas de caracterização complementares (AZARNIYA et al., 2019).

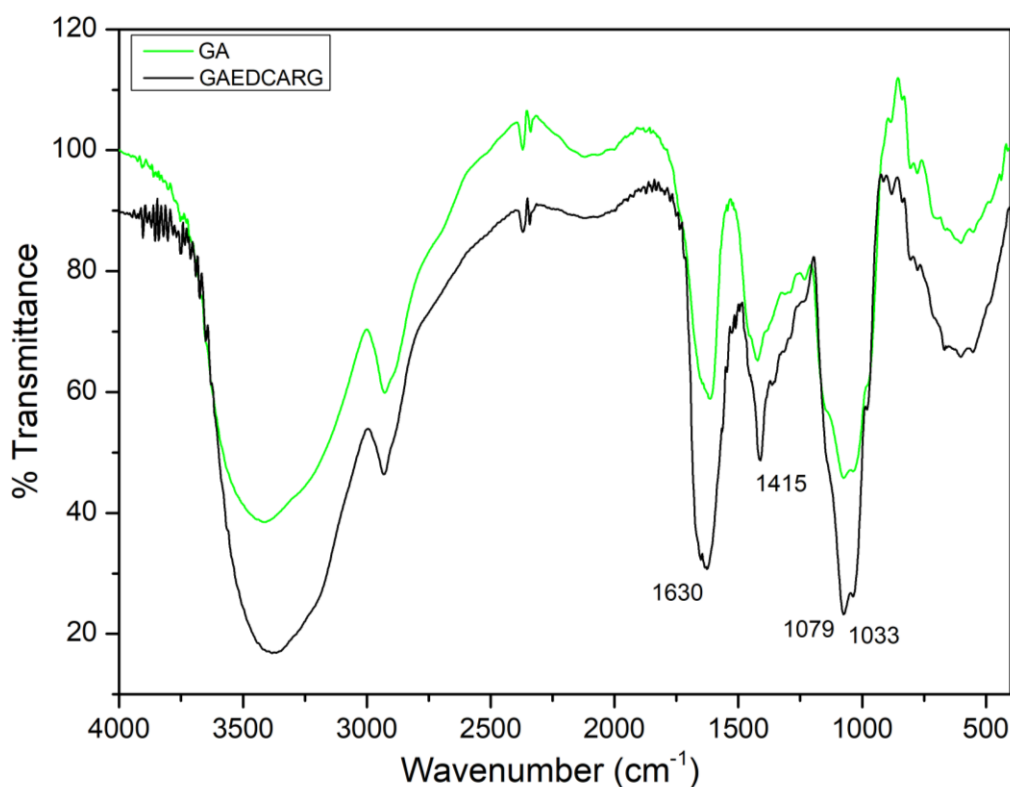
Devido a isso, optou-se por estudar o efeito individual de cada goma em uma reação de funcionalização com arginina utilizando o reagente EDC. No espectro da arginina, apresentado na Figura 21, pode-se identificar bandas características de aminoácidos, como na região de 3.345 cm^{-1} que apontam vibrações de deformação axial em ligações ($-\text{NH}_2$), livre em amins primárias. As bandas presentes mais à direita apontadas no espectro são associadas às vibrações de deformações angulares de entre os átomos de nitrogênio e hidrogênio que promovem ao espectro da arginina um perfil característico amplamente descrito na literatura (EBRAHIMINEZHAD et al., 2012).

Figura 21 - Espectro de FT-IR da arginina

Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao analisarmos a funcionalização apenas das gomas com arginina podemos notar que o comportamento entre elas se difere. Na funcionalização da goma arábica com o aminoácido (GAEDCARG) na Figura 22, foi possível observar um aumento do sinal de banda em 1.630 cm⁻¹ que indica carbonilas de amidas e sinais a direita do espectro (1.415 cm⁻¹, 1079 cm⁻¹ e 1.033 cm⁻¹) característicos de associação com aminoácidos.

Figura 22 - Espectro de FT-IR da funcionalização de goma arábica com arginina.

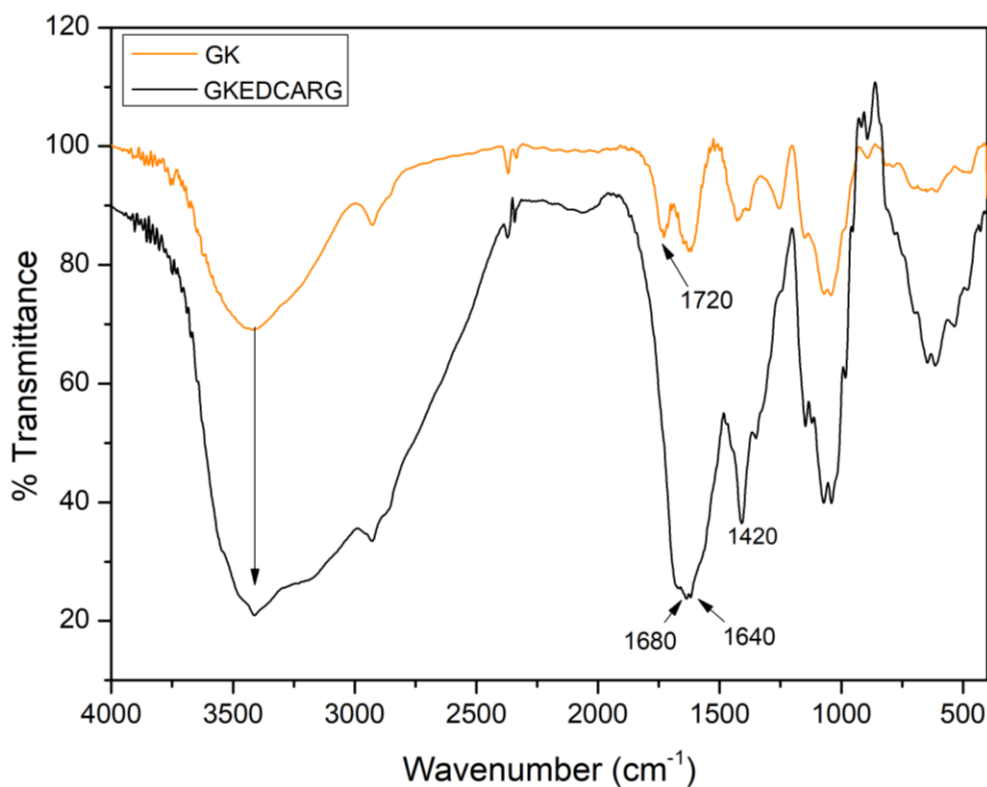


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos da funcionalização com a goma karaya (GKEDCARG) sugerem maior efetividade na ligação com a arginina, uma vez que dentre todas as gomas, a goma karaya nativa apresenta, mais evidentemente, uma banda em $\sim 1.720\text{ cm}^{-1}$ pertencente a grupos de (C=O) de ácidos carboxílicos. Em trabalhos que desenvolveram a funcionalização de polímeros utilizando EDC, a presença desse *fingerprint* no material de partida, é um indício fundamental por sugerir que estes grupos estariam disponíveis para reação. (RIBEIRO-VIANA; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2016a)

Na Figura 23, é significativo a intensificação dos sinais entre 3500-3200 cm^{-1} , resultante de uma associação polimérica e que está relacionada a sobreposições de estiramentos referentes aos grupos (O-H) e (N-H) presentes em aminas primárias e secundárias presentes na estrutura do material goma-arginina. A formação de uma ligação covalente entre o aminoácido e a carbonila é sugerida pela formação de novas bandas em 1.680 cm^{-1} e 1.640 cm^{-1} , frequências que se referem a (C=N) de iminas e estiramentos (C=O) de amidas, respectivamente, bem como a presença de um sinal em 1.420 cm^{-1} , distintivo de deformações angulares para identificação de (-CH₂) adjacentes a grupos carbonila.

Figura 23 – Espectro de FT-IR da funcionalização de goma karaya com arginina.

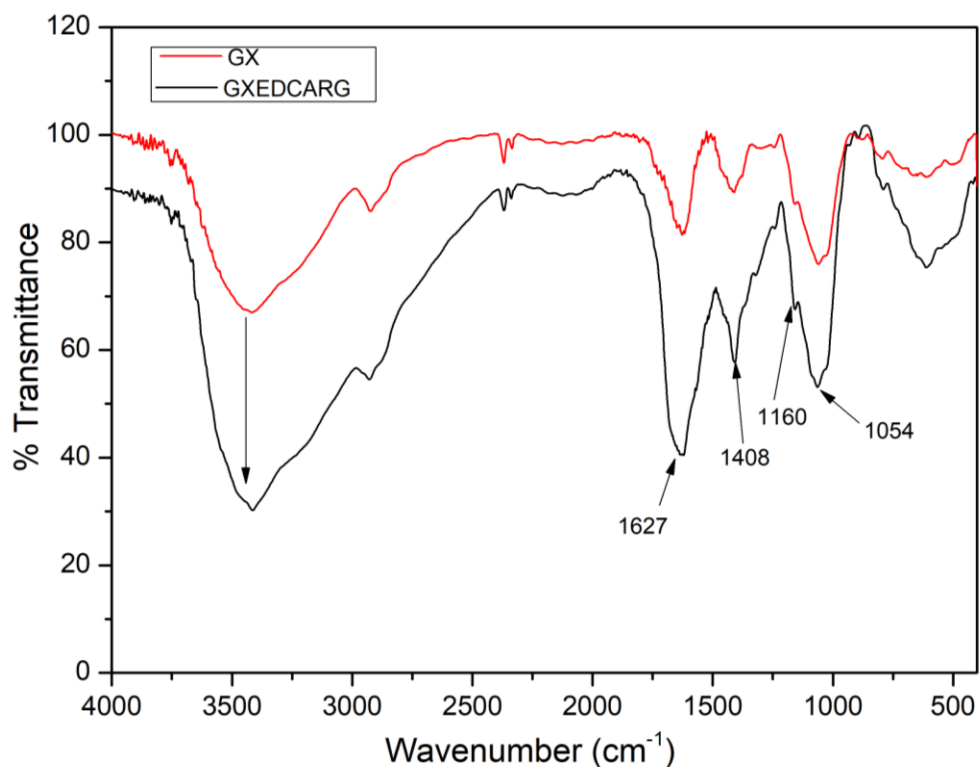


Fonte: Elaborado pelo autor.

No espectro de FT-IR referente a inserção de arginina em goma xantana (GXEDCARG) é possível identificar uma amplificação dos sinais entre 3.500 cm^{-1} e 3.200 cm^{-1} , sugerindo um aumento dos desdobramentos entre ligações (N-H) e (O-H) presente do material funcionalizado, como visto na Figura 24.

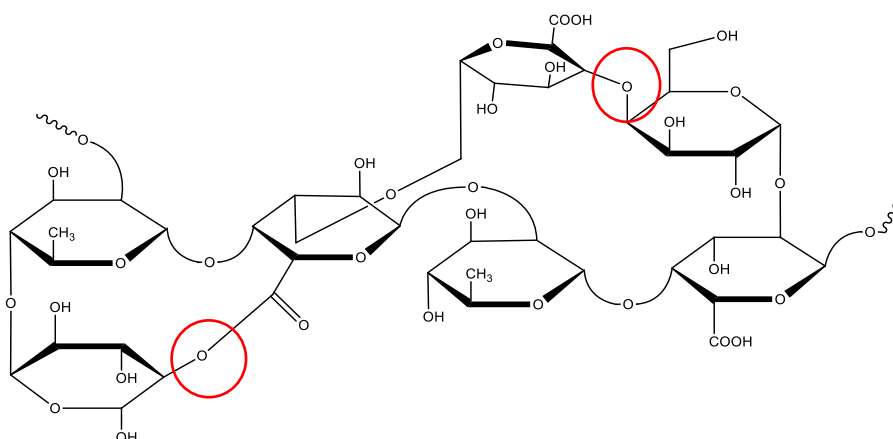
A banda presente em 1.627 cm^{-1} pode demonstrar a formação de uma ligação amida, enquanto as bandas em 1.160 cm^{-1} e 1.054 cm^{-1} indicam deformações axiais e angulares de ligações (C-O), sugerindo que parte da própria goma pode ter agido como nucleófilo associado aos sítios ativos presentes na estrutura do complexo GX-EDC, como apresentado na Figura 25.

Figura 24 – Espectro de FT-IR da funcionalização de goma xantana com arginina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25. Complexação entre os grupos de uma estrutura polimérica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Pelo destaque apresentado durante as metodologias empregadas neste trabalho e o surgimento de novas bandas sugerido a ligação covalente de arginina, a continuidade da pesquisa se deu de modo a priorizar a reação de funcionalização da goma karaya.

5.3 Quantificação de acidez dos compostos celulose-goma

Curvas de titulação e suas derivadas foram construídas a fim de se avaliar, por meio de uma contra titulação, o padrão comportamental dos filmes formados com a adição de gomas ácidas durante o processo fermentativo frente a condição controle (membrana de celulose bacteriana nativa)

Em uma titulação, o ponto de equivalência está relacionado com o ponto de inflexão da curva, ou seja, onde a mudança de concavidade corresponde à máxima ou mínima taxa de variação global da curva. Com o método das derivadas é possível, através de definições matemáticas, analisar de maneira expressa os valores obtidos durante o procedimento experimental. A derivada primeira permite uma análise apurada dos valores de variação presentes nos extremos do gráfico de uma curva e, por meio da derivada segunda, a caracterização de um comportamento geral e o perfil final de uma titulação. (BARROSO, 1987; CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2001).

Na Tabela 6 são apresentados os valores de pH obtidos para cada membrana *versus* a quantidade de ácido utilizado na contra-titulação.

Tabela 6 - Valores de pH obtidos para cada membrana.

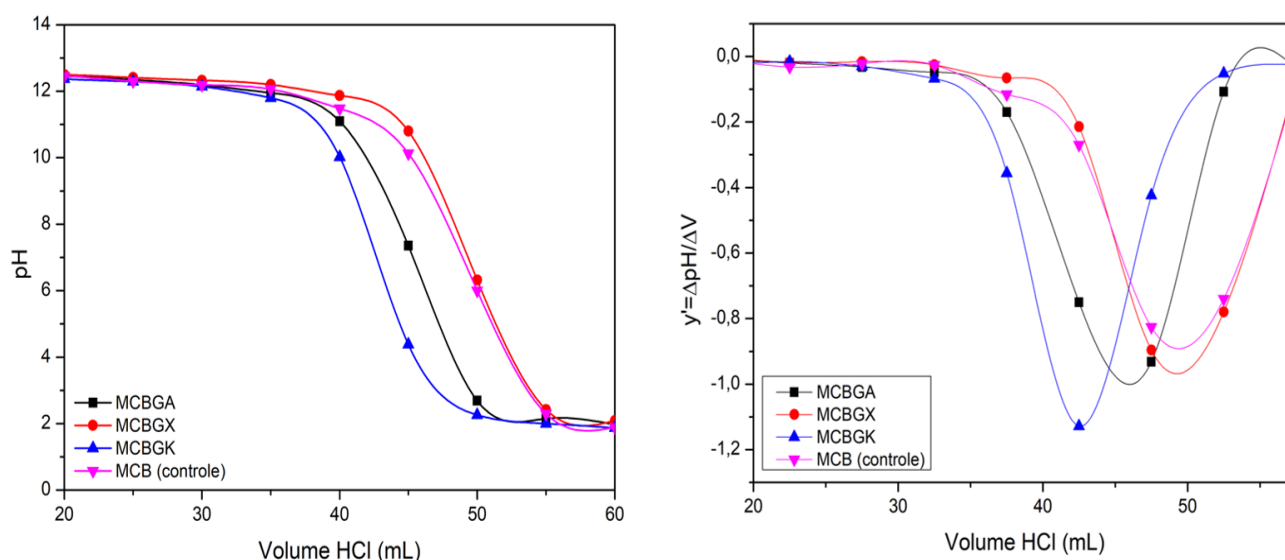
Volume de HCl	pH			
	(MCBGA)	(MCBGX)	(MCBGK)	(MCB controle)
0	12,62	12,82	12,82	12,68
5	12,6	12,52	12,63	12,56
10	12,6	12,55	12,53	12,50
15	12,51	12,53	12,48	12,5
20	12,45	12,5	12,37	12,46
25	12,35	12,41	12,29	12,30
30	12,19	12,33	12,14	12,19
35	11,95	12,20	11,80	12,06
40	11,10	11,87	10,02	11,48
45	7,35	10,8	4,38	10,13
50	2,69	6,32	2,26	6,00
55	2,15	2,42	2,00	2,30
60	1,97	2,09	1,87	1,89

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise da Figura 26, indica que os filmes que possuem GK e GA em sua composição atingiram a viragem de pH com um menor volume de ácido adicionado, enquanto a condição controle e o filme associado a GA, apresentaram valores similares frente a variação de pH do meio.

As membranas passam por um tratamento de limpeza com hidróxido de sódio após a interrupção do cultivo, o que deve-se levar em consideração durante a quantificação de acidez. Como foi proposta uma contra titulação entre HCl e NaOH, o consumo de hidróxido está sendo disputado entre o filme e o titulante, neste caso, se há grupos ácidos disponíveis nos filmes, uma menor quantidade de base é identificada, com menor consumo de HCl. (AGGERYD; OLIN, 1985; SKOOG, 2006).

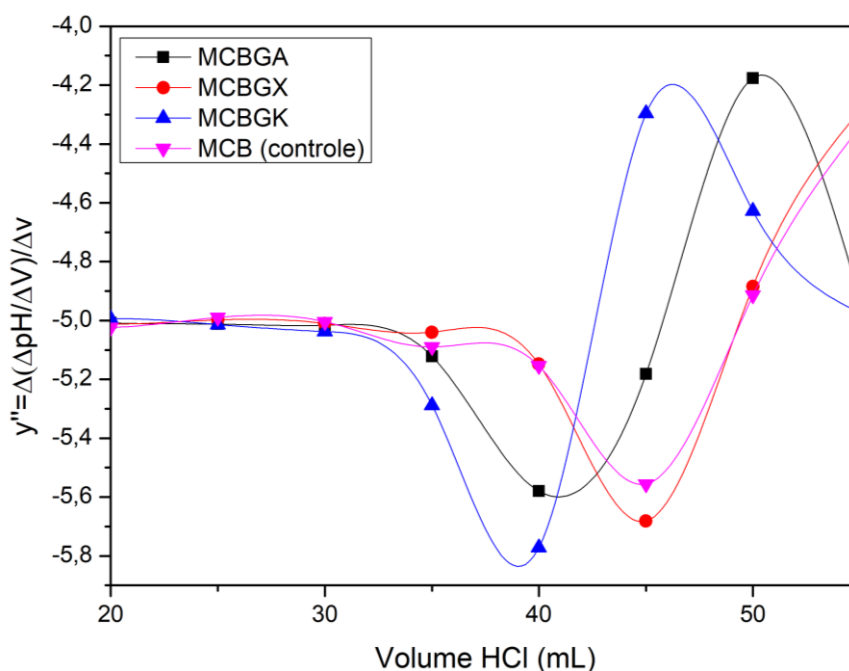
Figura 26 – Curvas de titulação e sua respectiva curva de primeira derivada dos compostos celulose-goma.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A diferença presente entre os filmes MCBGK e MCBGA pode sugerir que a superfície dos filmes apresenta características ácidas e esta diferença é referente a quantidade de ácido disponível no sistema de titulação. Com o desenvolvimento da derivada segunda, esta diferença se apresenta de maneira ainda mais evidente quando analisada a Figura 27.

Figura 27. Curva de segunda derivada dos compostos celulose-goma



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em um estudo que avaliou as propriedades da celulose de modo a utilizá-la como matriz para a produção de um complexo de polieletrólito, Vasconcelos e colaboradores (2019), demonstram que a produção de novos sítios de reação, podem formar interações eletrostáticas de modo a favorecer complexação e prototropismo no produto formado. Neste trabalho, possivelmente, a GA apresentou menos grupos ácidos disponíveis, sugerindo um possível processo de complexação, antes da produção de nanofibrilas de celulose, de modo a não ser inserida efetivamente na matriz polimérica.

5.4 Estudo térmico por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

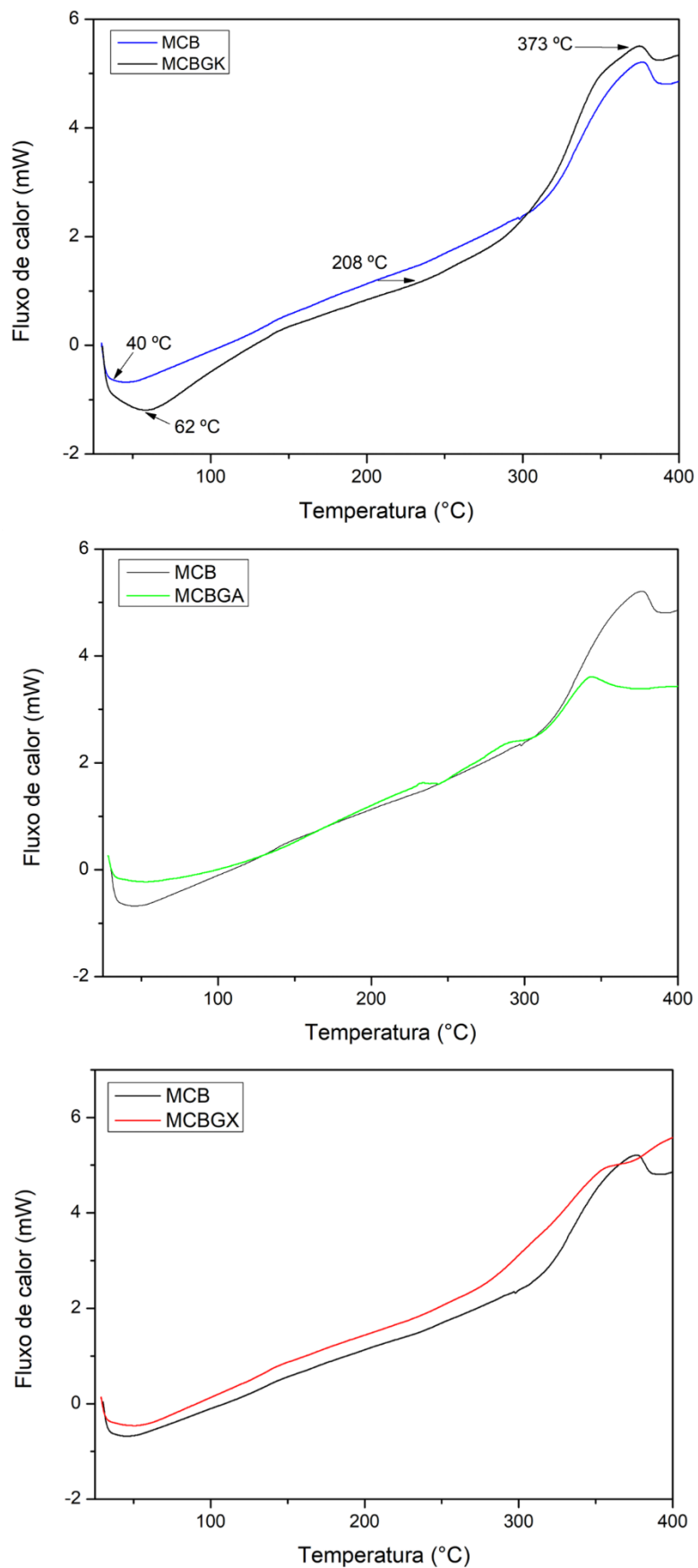
As curvas de DSC presentes nesta seção apresentaram comportamento verificado na literatura para membranas de celulose bacteriana, com presença de picos endotérmicos entre 25°C e 100°C, referentes a processos de desidratação, seguido por uma curva crescente, proveniente do alto grau de cristalinidade presente em sua estrutura, finalizando em picos exotérmicos presentes entre 380°C e 400°C, que Tischer e colaboradores (2010) retratam como oxidação de ligações glicosídicas, levando a perda de cristalinidade do material.

Entre a membrana de celulose nativa e a que possui goma karaya, foi possível identificar uma ampliação dos sinais endotérmicos entre 60°C e 70°C na MCBGK, que podem ser provenientes dos grupos hidroxila presentes no material misto, uma vez que associação de carboidratos aumentam o grau de retenção de água no material, promovendo maior interação de hidrogênio na matriz polimérica. Ao longo do processo, foi possível identificar que o polímero misto apresentou uma pequena variação de fluxo de calor durante o aumento da temperatura e um ligeiro aumento mais próximo ao final da queima, o esperado uma vez que os esqueletos de carbono presentes no polímero aumentam a temperatura de desidratação do material (KUMAR, SARATHCHANDIRAN, 2014; VASCONCELOS et al., 2019;)

Nos filmes MCBGA E MCBGX não foi possível identificar deslocamentos nas temperaturas de transição vítrea (T_g), o esperado seria um comportamento térmico básico do novo polímero celulose-goma, o que é levemente observado no filme que contém GA, contudo uma investigação mais aprofundada é necessária em estudos futuros, com técnicas térmicas complementares como TGA, DTG e DMA. (SABET et al., 2020)

Na amostra MCBGX, a curva contesta a incorporação de goma xantana durante o processo fermentativo às nanofibrilas de celulose, uma vez que, apesar de apresentar um perfil térmico levemente acima da amostra MCB, o ponto de degradação do material misto está mais baixo que o material controle, comportamento não esperado para o biomaterial misto, visto que a estabilidade cristalina presente na associação polimérica sugere que seja necessário uma temperatura maior para ocorrerem a T_g nas amostras dos produtos celulose-goma.

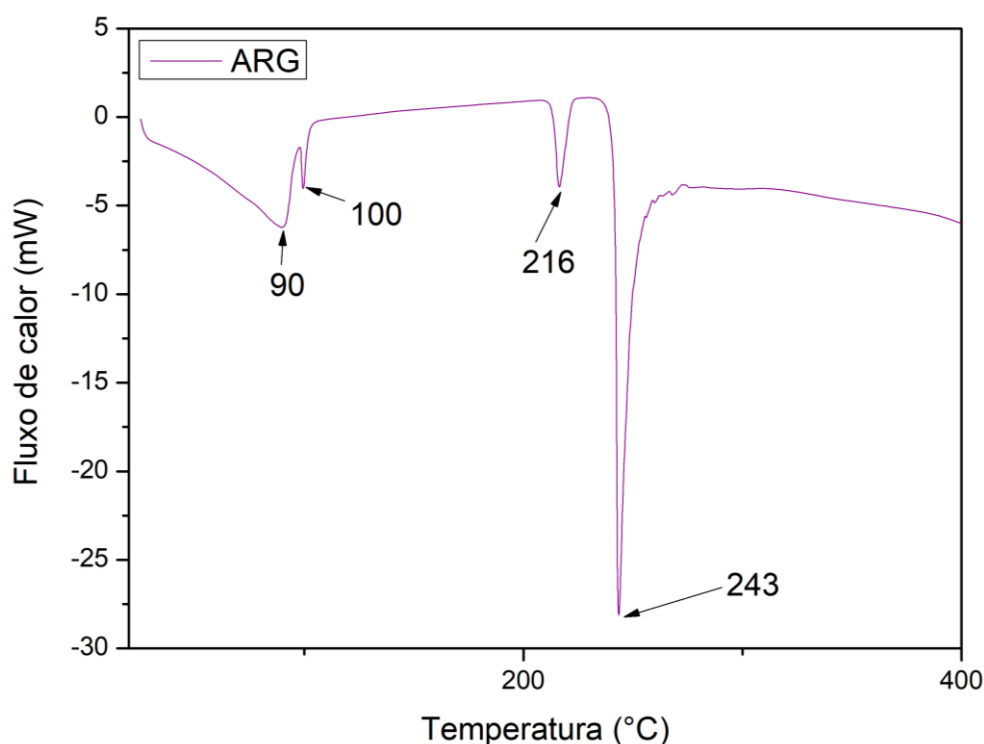
As curvas de DSC para MCB e as comparações com MCBGK, MCBGX e MCBGA estão apresentados na Figura 28.

Figura 28 - Curvas de DSC para MCB comparando com MCBGA, MCBGK e MCBGX.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na análise do perfil térmico da arginina (Figura 29), é possível identificar predominantemente a presença de picos endotérmicos, entre 90°C e 100°C, seguido de pontos em 216°C e 243°C, sendo este último, marcante em materiais cristalinos, característica fundamental em aminoácidos salinos e que corrobora com dados encontrados na literatura. É imprescindível conhecer as características do material a ser associado a matriz polimérica, visto que após a reação de conjugação, o produto deve possuir um perfil em que seja possível visualizar a intersecção dos compostos, bem como a sugestão de novos picos, provenientes das ligações formadas e que podem variar da Tg encontrada no material isolado. (CAMPBELL et al., 2013)

Figura 29 - Perfil de DSC para a arginina

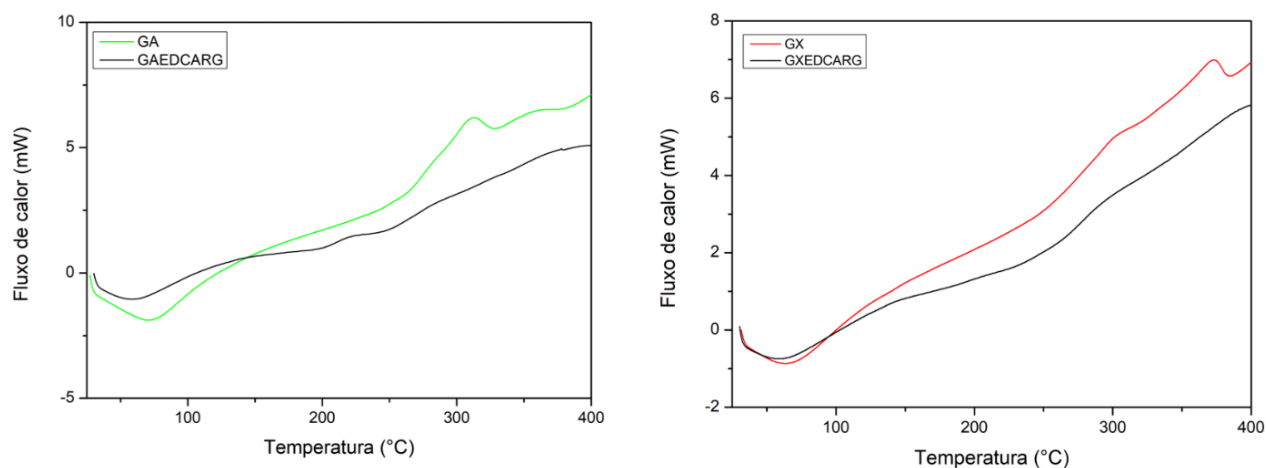


Fonte: Elaborado pelo autor.

Individualmente as gomas se comportaram de maneira distinta frente a funcionalização com arginina, como pode ser visto na Figura 30. No caso da GA nativa um pico endotérmico entre 50°C e 100°C e um exotérmico por volta de 300°C fornecia um padrão para o material, que não aparece no material funcionalizado, tampouco variações referentes a inserção de arginina. O mesmo pode-se dizer para a goma xantana funcionalizada com arginina (GXEDCARG), que além de não apresentar um pico exotérmico antes dos 400°C presente no perfil de goma xantana, sugere que a arginina não foi ligada covalentemente a estrutura da GX, sendo retirada durante os processos de

lavagem e diálise, corroborando a ideia de que ocorreu uma complexação da goma durante a adição do reagente carbodiimida. As curvas para ambos os materiais estão apresentadas na Figura 30.

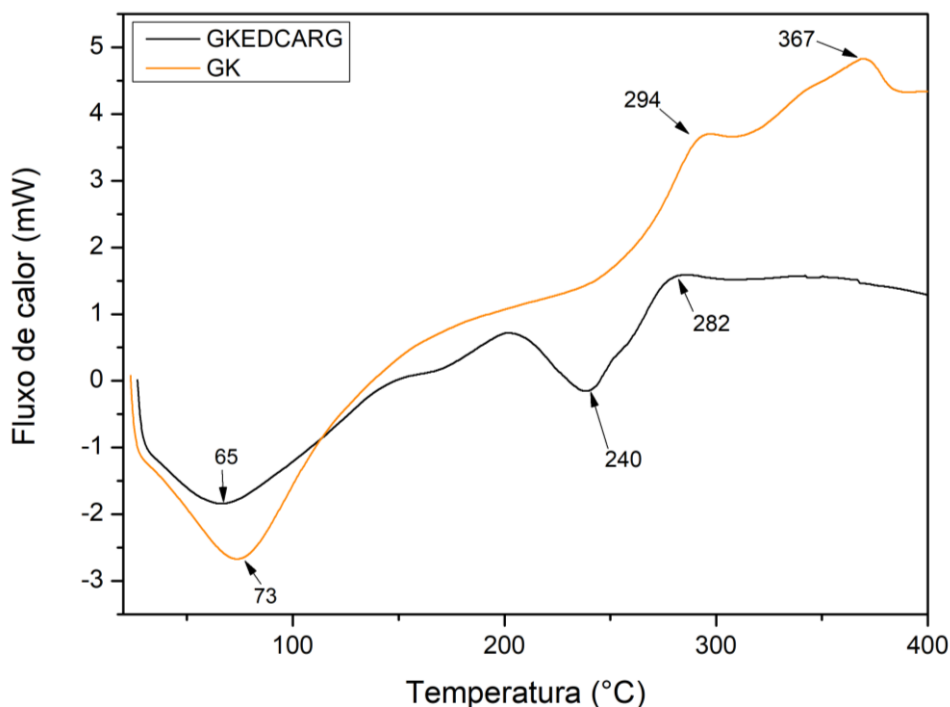
Figura 30 - Curvas de DSC para GA e GX e suas funcionalizações com ARG.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao ser incorporada arginina à GK (Figura 31), o material apresentou modificação notável no primeiro pico de desidratação, como apresentado na figura acima, variando de 73°C para 65°C, indicando deformações nas interações de hidrogênio presentes no biomaterial misto, que agora possui influência, além das hidroxilas presentes, das ligações -NH. O surgimento do pico endotérmico em 240°C está diretamente relacionado a presença de arginina e a sua decomposição que, como visto anteriormente, apresenta ponto de fusão nesta faixa. (LEE et al., 2019a) Os picos exotérmicos presentes na estrutura de goma karaya nativa entre 290°C e 370°C não aparecem no material funcionalizado que somado ao aparecimento de um pico em ~280°C, propõe que houve um deslocamento da temperatura de decomposição do material, que pode estar relacionado a interação entre os diferentes grupos funcionais no composto goma-arginina.

Figura 31 - Curvas de DSC para GK e sua funcionalização com ARG.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Avaliação da cristalinidade da celulose e dos compostos poliméricos por Difração de Raio-X

O difratograma da membrana de celulose bacteriana nativa quando comparado a que possui GA e GX, não apresentou diferença significativa em sua cristalinidade. Como na formação dos compostos MCBGA E MCBGX foi adicionado GA e GX, respectivamente, durante o inóculo, onde ainda não havia ocorrido a formação das nanofibrilas de celulose, é possível que as gomas se dispuseram de maneira mais dispersa no meio de cultivo, de modo que essas, por possuírem maior propriedade coagulante geraram uma incorporação menos efetiva as membranas, conseqüentemente apresentando cristalinidade similar ao controle.

Os picos característicos da celulose estão presentes na amostra MCB nos ângulos $14,53^\circ$, $16,9^\circ$ e $22,83^\circ$ e apresentados na Figura 32. Para os demais produtos, entretanto, é possível visualizar que nas condições com gomas, eles aparecem com menor intensidade, sugerindo que sua superfície, de alguma maneira, fora modificada

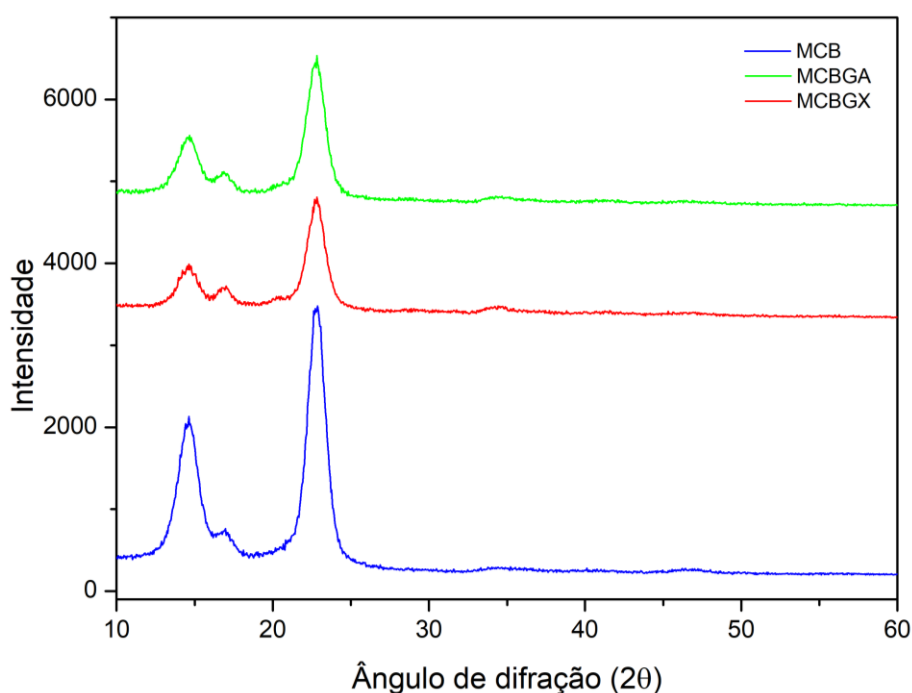
frente ao controle. Os índices de cristalinidade dos materiais estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Índice de cristalinidade (I_c) a partir de DRX para a MCB e os produtos celulose-goma

Amostras	I_{002}	I_{am}	I_c (%)
MCB	3477	410	88,2
MCBGA	6511	4873	25,15
MCBGK	5038	4070	19,21
MCBGX	4801	3503	27,03

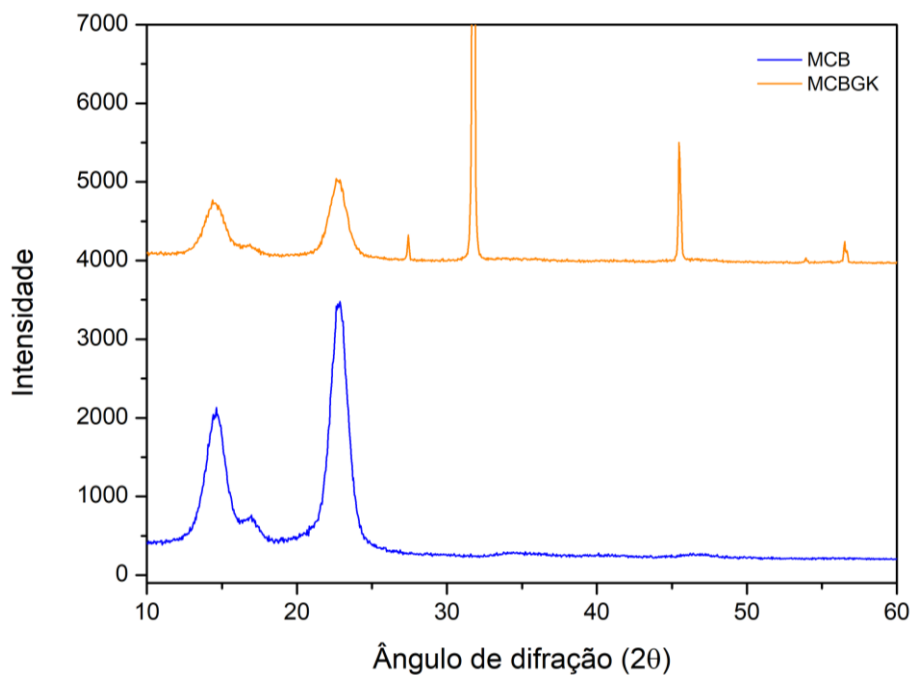
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 32 - Difratoograma comparativo entre amostras MCB, MCBGA e MCBGX.



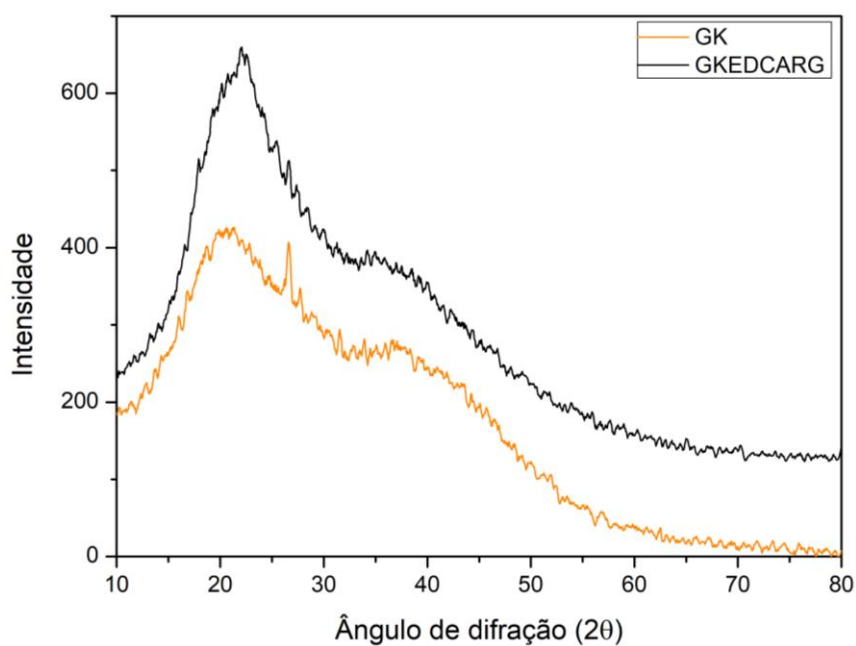
Fonte: Elaborado pelo autor.

O baixo índice de cristalinidade presente no MCBGK (19,21%) acrescentado aos picos cristalinos presentes no material misto, provavelmente proveniente dos aminoácidos e açúcares presentes na composição da goma karaya (GASHUA et al., 2015), apresentaram um perfil que se difere essencialmente da MCB, como visto na Figura 33.

Figura 33 - Difratoograma comparativo entre amostras MCB e MCBGK.

Fonte: Elaborado pelo autor.

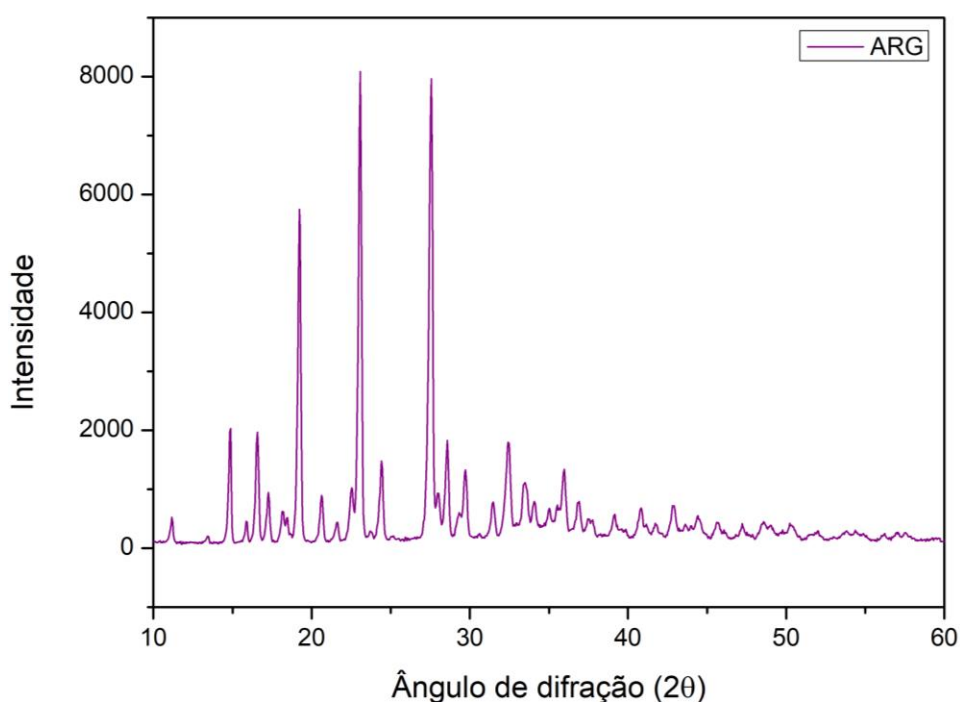
Como nas sessões anteriores, pelo destaque em seus resultados, verificou-se a maior influência nos efeitos de DRX sobre GK funcionalizada com arginina (Figura 34).

Figura 34 - Difratoograma comparativo entre GK e GKEDCARG

Fonte: Elaborado pelo autor.

No difratograma da arginina (Figura 36) é possível identificar uma quantidade extensa de picos nitidamente cristalinos que correspondem ao encontrado na literatura para este aminoácido.

Figura 35 - Difratograma da arginina



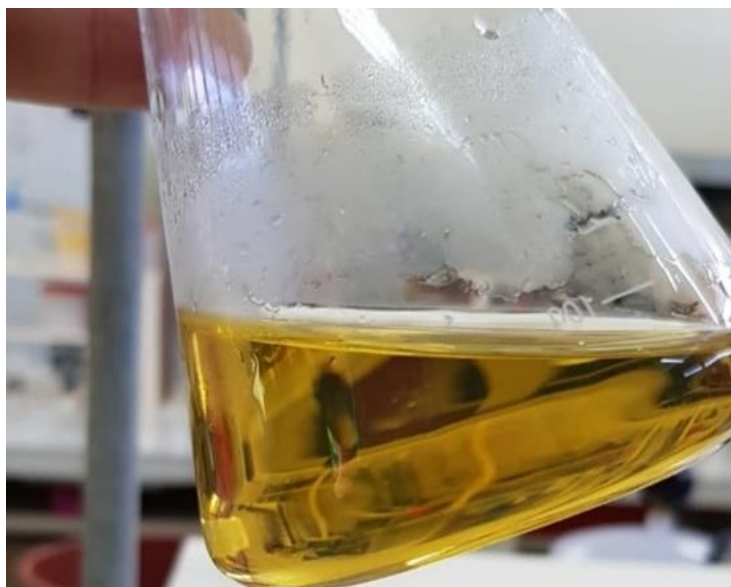
Fonte: Elaborado pelo autor.

Lee e colaboradores (2019), publicaram um trabalho que propôs a dispersão de arginina utilizando uma formulação de filme onde foi possível identificar que a associação de um material cristalino sob um amorfo apresenta características mistas, onde a matriz amorfa mantém suas propriedades nativas somado a traços cristalinos que podem ser visualizados no material e que deve ser validado sob outras técnicas de caracterização assim como o proposto deste trabalho.

5.5 Espectroscopia UV-Vis das nanopartículas de prata produzidas e da suspensão do produto ligado à prata.

As nanopartículas de prata produzidas como referência pelo método boro hidreto, apresentaram o aspecto ilustrado na Figura 37.

Figura 36 - Solução de AgNP a partir do método borohidreto

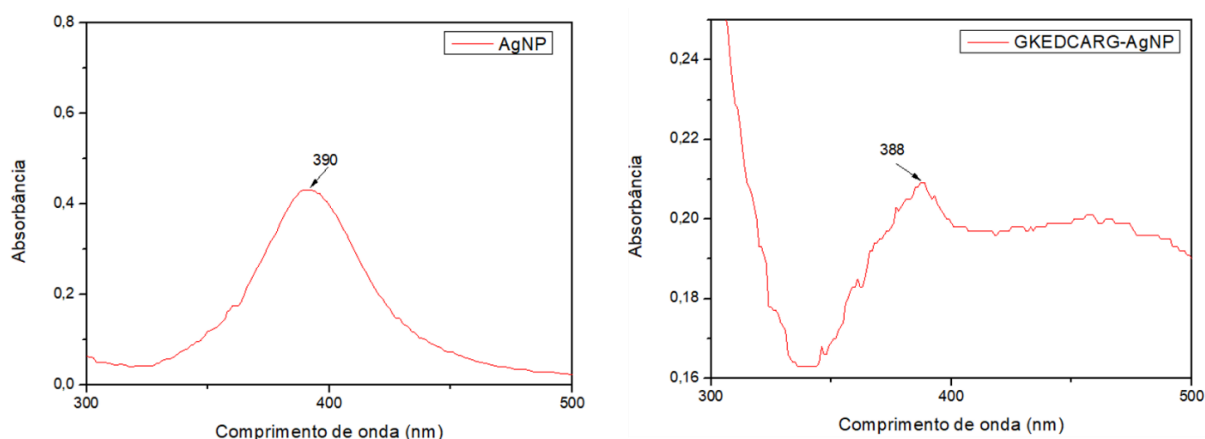


Fonte: Elaborado pelo autor.

A suspensão do material formado por goma karaya funcionalizado com arginina que foi associado com as nanopartículas de prata (GKEDCARG-AgNP) apresentou, como esperado, absorvância no comprimento de onda entre 380 e 400 nm, demonstrando a presença de nanopartículas entre 35 e 40 nm inseridas no produto (WU et al., 2014), como demonstrado na Figura 38(b). Estes resultados se assemelham a encontrados na literatura além de se corresponderem ao espectro obtido para as nanopartículas de referência Figura 38(a), certificando que o material produzido pode ser utilizado como suporte para associação de nanopartículas de prata.

Este resultado apresenta a goma karaya como um polímero a ser aplicado na área médica, visto que os resultados aqui demonstrados corroboram a WU e colaboradores (2014), que provaram que a inserção de AgNP em polissacarídeos, aumentam as propriedades de ação antimicrobiana do material, principalmente pelas nanopartículas possuírem boa afinidade com grupos enxofre e fósforo e possibilitarem a interrupção da divisão e respiração celular, se apresentando como uma opção alternativa para ação antimicrobiana.

Figura 37 - Espectro de Uv-vis da suspensão (a) de nanopartículas de prata e (b) GKEDCARG-AgNP.



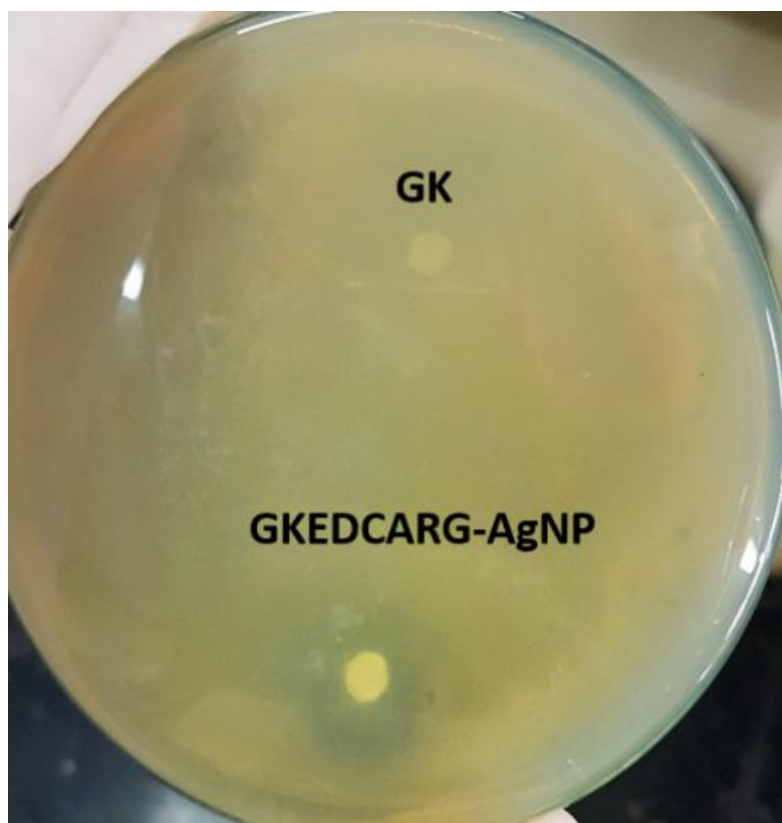
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 Antibiograma

Com o teste de antibiograma utilizando o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 39) é possível constatar a ação antibacteriana proposta ao associar nanopartículas de prata a polímero goma karaya-arginina.

Uma vez que as AgNP apresentam bioafinidade com grupos que contém enxofre e fósforo, a presença desse material frente ao interior da célula, impede a divisão e respiração celular por interação direta com o DNA. O resultado apresentado na Figura 39, se assemelha com trabalhos realizados por outros pesquisadores como (WU et al., 2014) e (PANÁČEK et al., 2018). A ação das AgNP justifica-se pela interação eletrostática promovida entre o metal e as membranas celulares. A carga positiva presente no composto se liga à carga negativa presente nas membranas celulares bacterianas, rompendo suas paredes e proteínas de superfície, levando à morte celular. (EL-SHERBINY et al., 2020)

Figura 38 - Antibiograma de GK vs GKEDCARG-AgNP frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: Próprio autor.

A atividade antibacteriana de AgNPs está fortemente relacionada ao seu tamanho e distribuição. Pela espectrofotometria Uv-Vis, estima-se que as partículas presentes na superfície de GKEDCARG-AgNP possuam o tamanho entre 5-10 nm, levando a crer que parte das partículas se agregaram para minimizar sua energia no processo de preparação, entretanto, não houve deterioração total de suas propriedades antibacterianas, como visto pelo halo formado.

O principal desafio é encontrar uma matriz adequada para hospedar uniformemente as AgNPs, para uma atividade antimicrobiana eficiente, onde haja redução dos íons prata e estabilização das partículas uniformemente, apresentando um biomaterial nanocompósito híbrido e antibacteriano (CAPANEMA et al., 2018; JASMINE et al., 2016), e o compósito goma-arginina provou ser eficaz como polímero multifuncional.

6 CONCLUSÃO

Dentre as três gomas utilizadas como material de partida para a funcionalização com arginina, a que melhor apresenta efetividade na formação da ligação amida entre o ácido carboxílico presente na estrutura da goma e a amina do aminoácido arginina foi a goma karaya, evidenciado por meio das técnicas de caracterização (FT-IR, DRX e DSC).

A inserção de gomas ácidas durante o processo fermentativo alterou as características da membrana de celulose formada, tendo sua quantidade de ácido aumentada, verificada pela quantificação de acidez por contra-titulação. Por meio da técnica de DRX foi possível determinar que os produtos celulose-goma apresentam uma baixa cristalinidade quando comparadas a membrana de celulose nativa, levando a crer que a presença das gomas no meio de cultivo altera a formação das nanofibrilas da celulose bacteriana.

A associação de nanopartículas de prata ao material formado pela conjugação de goma karaya e arginina ocorreu de maneira satisfatória sendo possível identificar, por meios dos dados da espectroscopia do Uv-Vis, sinais da prata ligada ao polissacarídeo e pelo antibiograma que apresentou atividade bactericida em *Pseudomonas aeruginosa*, apresentando um composto polimérico com boa aceitação de nanopartículas metálicas e mais uma alternativa em reações de síntese envolvendo a Química de Carboidratos.

Estes resultados permitem concluir que dentre as gomas ácidas testadas foi possível incorporar a goma karaya à membrana de celulose bacteriana, e que este material pode ser funcionalizado com arginina incorporando nanopartículas de prata. As membranas assim formadas a partir de biopolímeros e processos químicos em água tem atividade antibiótica, característica buscada para curativos e bandagens de uso médico e cosmético. Como fruto deste trabalho, houve o depósito de uma patente junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).

REFERÊNCIAS

- ABDOLYUSEFI, E. N. et al. Antibacterial assessment of zinc sulphide nanoparticles against streptococcus pyogenes and acinetobacter baumannii. **Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii**, v. 18, n. 1, p. 171–188, 2020.
- ADITIVOS&INGREDIENTES. As Grandes Gomas. **Aditivos e Ingredientes**, v. 79, n. jun, p. 25–38, 2011.
- AGGERYD, I.; OLIN, Å. Determination of the degree of substitution of sodium carboxymethylcellulose by potentiometric titration and use of the extended henderson-hasselbalch equation and the simplex method for the evaluation. **Talanta**, v. 32, n. 8 PART 1, p. 645–649, 1985.
- ALI, B. H.; ZIADA, A.; BLUNDEN, G. Biological effects of gum arabic : A review of some recent research. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 1–8, 2009.
- ATGIÉ, M. et al. Gum Arabic in solution: Composition and multi-scale structures. **Food Hydrocolloids**, v. 91, n. January, p. 319–330, 2019.
- AZARNIYA, A. et al. International Journal of Biological Macromolecules Modi fi cation of bacterial cellulose / keratin nano fi brous mats by a tragacanth gum-conjugated hydrogel for wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 280–289, 2019.
- BARNARD, A. S. Size, Shape, Stability, and Color of Plasmonic Silver Nanoparticles. 2014.
- KUMAR, Suresh P., SARATHCHANDIRAN, I. Characterization and standardization of gum karaya. **International Journal of Biopharmaceutics**. v. 5. p.142-151, 2014.
- BILGI, E. et al. Optimization of bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylinus using carob and haricot bean. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016.
- BROWN, R. A. In the beginning there were soft collagen-cell gels: Towards better 3D connective tissue models? **Experimental Cell Research**, 2013.
- CACICEDO, M. L. et al. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 172–180, 2016.
- CAMPBELL, L. et al. Local arginase 1 activity is required for cutaneous wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 10, p. 2461–2470, 2013.
- CAPANEMA, N. S. V. et al. Physicochemical properties and antimicrobial activity of biocompatible carboxymethylcellulose-silver nanoparticle hybrids for wound dressing and epidermal repair. **Journal of Applied Polymer Science**, 2018.
- CHAWLA, P. et al. Gum arabic capped copper nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 232–242, 2020.
- CORRAL, M. L. et al. Bacterial nanocellulose as a potential additive for wheat bread. **Food Hydrocolloids**, v. 67, p. 189–196, 2017.
- CORREIA, I. et al. Biological properties and pharmacological potential of plant exudates. **Food Research International**, v. 105, n. November 2017, p. 1039–1053, 2018.

DANIELAK, A. Metabolic pathways of L-arginine and therapeutic consequences in tumors. **Advances in Medical Sciences**, v. 64, n. August 2018, p. 104–110, 2019.

DE OLIVEIRA, S. A. et al. Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 642–653, 2017.

DHIMAN, M.; SINGH, A.; SHARMA, M. M. A review on *Sterculia urens* Roxb.: a boon to the livelihood for tribal people and industry. **Industrial Crops and Products**, v. 130, n. January, p. 341–351, 2019.

DONG, C.; LV, Y. **Application of collagen scaffold in tissue engineering: Recent advances and new perspectives** Polymers Multidisciplinary Digital Publishing Institute, , fev. 2016.

DONINI, Í. A. N. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Ecletica Química**, 2010.

DURÁN, N. et al. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Quim. Nova**, v. 42, n. 2, p. 206–213, 2019.

EBRAHIMINEZHAD, A. et al. Impact of amino-acid coating on the synthesis and characteristics of iron-oxide nanoparticles (IONs). **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 33, n. 12, p. 3957–3962, 2012.

EL-SHERBINY, G. M. et al. Antimicrobial activity of biosynthesised silver nanoparticles against multidrug-resistant microbes isolated from cancer patients with bacteraemia and candidaemia. **Indian Journal of Medical Microbiology**, 2020.

ENDLER, A.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, C.; PERSSON, S. Glycobiology: Cellulose squeezes through. **Nature Chemical Biology**, 2010.

FARHADI, G. B. N.; KHOSRAVI-DARANI, K.; NEJAD, B. N. Enhancement of xanthan production on date extract using response surface methodology. **Asian Journal of Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 3887–3890, 2012.

FROIDEVAUX, V. et al. Biobased Amines: From Synthesis to Polymers; Present and Future. **Chemical Reviews**, 2016.

GARCÍA-OCHOA, F. et al. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, 2000.

GARDNER, K. H.; BLACKWELL, J. The structure of native cellulose. **Biopolymers**, 1974.

GASHUA, I. B. et al. Characterisation and molecular association of Nigerian and Sudanese Acacia gum exudates. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 405–413, 2015.

GATENHOLM, P.; KLEMM, D. Bacterial nanocellulose as a renewable material for biomedical applications. **MRS Bulletin**, 2010.

GODINHO, J. F. et al. Incorporation of Aloe vera extracts into nanocellulose during biosynthesis. **Cellulose**, 2016.

GOELZER, F. D. E. et al. Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. **Materials Science & Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 546–551, 2009.

GORGIEVA, S. Bacterial cellulose as a versatile platform for research and development of biomedical materials. **Processes**, 2020.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **The Biochemical journal**, 1954.

HO, G. J. et al. Carbodiimide-Mediated Amide Formation in a Two-Phase System. A High-Yield and Low-Racemization Procedure for Peptide Synthesis. **Journal of Organic Chemistry** Academic Press, , 1995.

HU, W. et al. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, 2014.

JAFARI, N. et al. Effect of Silver Particle Size on Color and Antibacterial Properties of Silk and Cotton Fabrics. **Fibers and Polymers** v. 17, n. 6, p. 888–895, 2016.

JASMINE, R. et al. Investigating the mode of action of silver nanoparticles stabilized by *Adathoda vasica* targeted against multidrug resistant [MDR] urinary isolates. **Der Pharmacia Lettre**, 2016.

KUMAR, A.; RAO, K. M.; HAN, S. S. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 180, n. September 2017, p. 128–144, 2018.

KWAK, M. H. et al. Bacterial cellulose membrane produced by *Acetobacter* sp. A10 for burn wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 387–398, 2015.

LAMBONI, L. et al. Silk Sericin-Functionalized Bacterial Cellulose as a Potential Wound-Healing Biomaterial. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 9, p. 3076–3084, 2016.

LEE, G. W. et al. Improved Rapid Action of Dapoxetine Hydrochloride & L-arginine Solid Dispersion Using Film Formulation. **Macromolecular Research**, v. 27, n. 4, p. 354–359, 2019a.

LEE, S. et al. Xanthan Gum Biopolymer as Soil-Stabilization Binder for Road Construction Using Local Soil in Sri Lanka. **Journal of Materials in Civil Engineering**, 2019b.

LEGLER, A. V et al. Synthesis and antimicrobial activity of silver complexes with arginine and glutamic acid. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. v. 35, n. 9, p. 501–503, 2001.

LI, P. et al. Biosynthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* LREL-1 using kitchen waste as the sole substrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 684–691, 2016.

LI, Y. et al. Bacterial cellulose-hyaluronan nanocomposite biomaterials as wound dressings for severe skin injury repair. **Journal of Materials Chemistry B**, 2015.

LIANG, H. W. et al. Bacterial cellulose derived nitrogen-doped carbon nanofiber aerogel: An efficient metal-free oxygen reduction electrocatalyst for zinc-air battery. **Nano Energy**, v. 11, p. 366–376, 2015.

LIN, S. P. et al. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. **Cellulose**, 2013.

LÓPEZ-FRANCO, Y. et al. Other exudates: Tragacanth, karaya, mesquite gum and larchwood arabinogalactans. In: **Handbook of Hydrocolloids: Second Edition**. [s.l.: s.n.].

LUVIELMO, M.; SCAMPARINI, A. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, 2009.

MARIOD, A. A. **Functional Properties of Gum Arabic**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

- MAUTNER, A. Nanocellulose water treatment membranes and filters: a review. **Polymer International**, 2020.
- MIKUŠ, Ľ.; VALÍK, Ľ.; DODOK, L. Usage of hydrocolloids in cereal technology. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 59, n. 5, p. 325–334, 2011.
- NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. **Bioconjugate Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 123–130, 1995.
- NAM, S. et al. Segal crystallinity index revisited by the simulation of X-ray diffraction patterns of cotton cellulose I β and cellulose II. **Carbohydrate Polymers**, v. 135, p. 1–9, 2016.
- PADIL VINOD, V. T. et al. Gum karaya (*Sterculia urens*) stabilized zero-valent iron nanoparticles: characterization and applications for the removal of chromium and volatile organic pollutants from water. **RSC Advances**, 2017.
- PANÁČEK, A. et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. **Nature Nanotechnology**, 2018.
- PICHETH, G. F. et al. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 97–106, 2017.
- PINKERT, A. et al. Ionic liquids and their interaction with cellulose. **Chemical Reviews**, 2009.
- RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2015.
- RIBEIRO-VIANA, R. M.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Preparation of succinylated cellulose membranes for functionalization purposes. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 21–28, 2016a.
- RIBEIRO-VIANA, R. M.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Preparation of succinylated cellulose membranes for functionalization purposes. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 21–28, set. 2016b.
- ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological Reviews**, 1991.
- SABET, S. et al. The interactions between the two negatively charged polysaccharides: Gum Arabic and alginate. **Food Hydrocolloids**, v. 112, n. July 2020, p. 106343, 2021.
- SCHERNER, M. et al. In vivo application of tissue-engineered blood vessels of bacterial cellulose as small arterial substitutes: Proof of concept? **Journal of Surgical Research**, 2014.
- SHOEIB, T. et al. A comparison of copper (I) and silver (I) complexes of glycine, diglycine and triglycine. **Physical Chemistry Chemical Physics**. p. 853–861, 2001.
- SHOEIB, T.; SIU, K. W. M.; HOPKINSON, A. C. Silver Ion Binding Energies of Amino Acids: Use of Theory to Assess the Validity of Experimental Silver Ion Basicities Obtained from the Kinetic Method. **Journal of Physical Chemistry A**. p. 6121–6128, 2002.
- SZYMAŃSKA-CHARGOT, M.; CYBULSKA, J.; ZDUNEK, A. Sensing the structural differences in cellulose from apple and bacterial cell wall materials by Raman and FT-IR Spectroscopy. **Sensors**, v. 11, n. 6, p. 5543–5560, 2011.

THERMO FISHER. Chemical Reactivity of Crosslinkers and Modification Reagents. **Crosslinking technology Reactivity chemistries, applications and structure references**, p. 3–4, 2012.

TISCHER, P. C. S. F. et al. Nanostructural reorganization of bacterial cellulose by ultrasonic treatment. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 5, p. 1217–1224, 2010.

TRONSER, T. et al. Biological and Medical Applications of Materials and Interfaces Bacterial cellulose promotes long-term stemness of mESC Bacterial cellulose promotes long-term stemness of mESC. 2018.

TSOUKO, E. et al. Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. **International Journal of Molecular Sciences**, 2015.

ULLAH, H. et al. Functionalized Bacterial Cellulose Microparticles for Drug Delivery in Biomedical Applications. **Current Pharmaceutical Design**, 2019.

VASCONCELOS, N. F. et al. Chemically modified cellulose nanocrystals as polyanion for preparation of polyelectrolyte complex. **Cellulose**, v. 26, n. 3, p. 1725–1746, 2019.

VITTA, S.; THIRUVENGADAM, V. Multifunctional bacterial cellulose and nanoparticle-embedded composites. **Current Science (Bangalore)**, 2012.

WANG, Z. et al. One-pot green synthesis of biocompatible arginine-stabilized magnetic nanoparticles. v. 4, 2009.

WU, J. et al. In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 1, p. 762–771, 2014.

YE, S. et al. Flexible Amoxicillin-Grafted Bacterial Cellulose Sponges for Wound Dressing: In Vitro and in Vivo Evaluation. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 6, p. 5862–5870, 2018.

YOUSAF, A. et al. STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF A SILVER (I) COMPLEX OF ARGININE. **Journal of Structural Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 1713–1717, 2015.

ANEXO – DEPÓSITO DE PATENTE

07/12/2020 870200153213
07:32

29409161919337376

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**Número do Processo:** BR 10 2020 024900 2**Dados do Depositante (71)**

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 78640489000153**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS
UNIVERSITARIO**Cidade:** Londrina**Estado:** PR**CEP:** 86055-900**País:** Brasil**Telefone:** (043) 3371 5812**Fax:** (043) 3371 5812**Email:** aintecpi@uel.br

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ - UTFPR**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 75101873000190**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** Avenida Sete de Setembro, 3165**Cidade:** Curitiba**Estado:** PR**CEP:** 80230-901**País:** BRASIL**Telefone:** (41) 331 04422**Fax:****Email:** inovacao@utfpr.edu.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE GOMAS VEGETAIS COM CONJUGAÇÃO DE PRÓTEÍNAS E SEU PRODUTO RESULTANTE

Resumo: A presente invenção descreve a modificação química da superfície de uma goma ácida de origem vegetal (goma karaya) com a conjugação de uma proteína hidrossolúvel (colágeno). Propõe-se com essa invenção gerar glicoproteínas sintéticas por funcionalização covalente entre gomas ácidas e proteínas de interesse, utilizando um protocolo em que não se utilize solventes orgânicos, aproveitando as características estruturais desses materiais, assim otimizando o processo de modificação química com reduzida geração de resíduos tóxicos. Foram realizadas conjugações com etilenodiamina e também funcionalização com o colágeno, utilizando o reagente carbodiimida para formar uma ligação amida entre os grupos. Assim, a presente invenção soluciona um problema técnico relacionado à conjugação de biopolímeros naturais tais quais: as gomas ácidas de origem vegetal, como a goma karaya, a goma ghatti e a goma arábica com proteínas de interesse, como o colágeno que excede importância nas mais diversas áreas.

Figura a publicar: FIG 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 3

Nome: RENATO MÁRCIO RIBEIRO VIANA

CPF: 05598690616

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Avenida Madre Leonia Milito, 1325, Bela Suíça

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86050-270

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecpi@uel.br

Inventor 2 de 3

Nome: CASSIANO BORGES DE MORAES

CPF: 44911796898

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Rubens Ávila, 150, apto 14, Bloco I

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86055-690

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecpi@uel.br

Inventor 3 de 3

Nome: CESAR AUGUSTO TISCHER

CPF: 94001529904

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Avenida Gil de Abreu e Souza, n. 2000, casa 1309, Esperança

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86058-100

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecpi@uel.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	RELATÓRIO DESCRITIVO rev .pdf
Reivindicação	REIVINDICAÇÕES (1).pdf
Desenho	DESENHOS rev.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Liquidação - MODIFICACAO QUIMICA DE GOMAR VEGETAIS.pdf
Portaria	Decreto nomeação SERGIO e DÉCIO.pdf
Resumo	RESUMO rev .pdf
Procuração	Procuração UTFPR.pdf
Documento de Cessão	Documentos Escaneados 1 (2)-convertido.pdf
Documento de Cessão	ASSINADO Declaração de cessão - Cassiano Borges de Moraes.pdf
Documento de Cessão	[ASSINADO] Declaração de cessão - Renato Márcio Ribeiro Viana.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.