



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Laura Cassol Mohr

**Desenvolvimento de filmes de acetato de celulose antimicrobianos pela adição de acetato de geranila**

Florianópolis

2022

Laura Cassol Mohr

**Desenvolvimento de filmes de acetato de celulose antimicrobianos pela adição de acetato de geranila**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química

Orientador: Prof. Humberto Gracher Riella, Dr.

Coorientador: Prof. Márcio Antônio Fiori, Dr.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mohr, Laura Cassol

Desenvolvimento de filmes de acetato de celulose antimicrobianos pela adição de acetato de geranila / Laura Cassol Mohr ; orientador, Humberto Gracher Riella, coorientador, Márcio Antônio Fiori, 2022.

159 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Acetato de celulose antimicrobiano. 3. Acetato de geranila. 4. Biocompatibilidade. I. Riella, Humberto Gracher . II. Fiori, Márcio Antônio. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título. |

Laura Cassol Mohr  
**Desenvolvimento de filmes de acetato de celulose antimicrobianos pela adição de acetato de geranila**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Elita Fontenele Urano de Carvalho, Dra.  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

Profa. Josiane Maria Muneron de Mello, Dra.  
Universidade Comunitária da Região de Chapecó - Unochapecó

Prof. Leonardo Bresciani Canto, Dr.  
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Certificamos que esta é a **versão original** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

---

Profa. Débora de Oliveira, Dra  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Humberto Gracher Riella, Dr  
Orientador

Florianópolis, 2022.

*Para meu esposo Rafael, com todo meu amor.  
Para a minha família, com toda minha gratidão.*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida e por Ele me dar, diariamente, uma dose de coragem para vivê-la.

Ao meu esposo Rafael Celuppi, por nunca me deixar desistir, me instigando a ser sempre a minha melhor versão e mostrando, todos os dias, o quanto a vida é bela.

Aos meus pais Flávio José Mohr e Marilde Cassol Mohr, por viverem todos os sonhos comigo, pelo amor incondicional e por acreditarem em mim muito mais do que eu mesma. Vocês são os meus exemplos, eu nada seria sem vocês.

À minha irmã Larissa Cassol Mohr, que com seu bom-humor ímpar me faz feliz todos os dias. Obrigada por entender a minha ausência física algumas vezes e por ser a real figura de irmã, com toda a responsabilidade e o amor que o termo exige. Você é parte de mim.

Também agradeço à família do meu esposo, que se tornou a minha segunda família e acompanhou todas as etapas do doutoramento, vivendo-as comigo. Obrigada pelo apoio.

Agradeço imensamente ao meu orientador, professor Dr. Humberto Gracher Riella, pela oportunidade e pelo suporte durante o período de pesquisa.

Ao meu coorientador, Dr. Márcio Antônio Fiori, pela condução do trabalho, estando presente do início ao fim do processo, com toda sabedoria e paciência que lhe é natural, mostrando sempre que o caminho pode ser doloroso, mas é valioso. Você é um exemplo de profissional, tenho muito a lhe agradecer.

À professora Dra. Liz Girardi Müller, por dedicar seu valioso tempo para me auxiliar com toda a parte biológica. Aprendi muito com você. Foi um prazer te encontrar na minha caminhada.

Ao professor Dr. Thiago André Carniel, pelas contribuições nas análises mecânicas.

À professora Dra. Rubieli Carla Frezza Zeferino e seus bolsistas de pesquisa, pelo fornecimento do éster.

Aos técnicos de laboratório da Unochapecó, em especial Natascha Trevisani, Débora Carneiro Leite e Adriano Rosina por sempre estarem dispostos a ajudar.

À Taismara Simas, responsável pelos laudos histopatológicos, por estar sempre disponível, não medindo esforços para sanar todas as dúvidas. Você é um exemplo de profissional.

Ao Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI), em especial ao Jocinei Dognini, pelo auxílio com as caracterizações.

À Liziane, do PósENQ, por atender a minha demanda (independente da hora), com toda gentileza e disposição. Obrigada Lizi, você nem imagina o quanto me ajudou durante o processo.

À Izabela Pereira, por me auxiliar com a parte documental das análises *in vivo*.

Às alunas Keli Calza, Maria Lúcia Miranda, Letícia Vidor Morgan e Viviane Bufon Mucelini por me auxiliarem nos procedimentos *in vivo*. Vocês foram sensacionais.

À aluna Letícia Bavaresco Cima, obrigada pelo auxílio em todas as etapas experimentais, saiba que seria muito mais difícil sem você. Tenho certeza que construímos laços que vão muito além do laboratório. Sua dedicação te levará longe. Conte sempre comigo.

Às minhas amigas, comadres, colegas de vida, Jaqueline Scapinello e Ana Paula Capelezzo, por deixarem a jornada mais alegre. É muito bom saber que posso contar com vocês. Em especial, amiga Ana, irmã do coração.... Obrigada pelas aventuras, desafios vencidos e alegrias durante essa etapa, não teria o mesmo brilho sem a sua companhia. Somos melhores juntas, que nunca esqueçamos disso.

À minha amiga Michaela Coradi, por ouvir os meus desabafos e com sua experiência me aconselhar na jornada. Obrigada pela sua amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pela oportunidade.

À Unochapecó, pela oportunidade e fornecimento do espaço físico para o trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante a primeira etapa do doutoramento.

Neste momento percebo quantos foram os envolvidos no processo (certamente mais numerosos que os aqui destacados, a quem eu agradeço também). Finalizo esta etapa com satisfação, muito grata por todo amadurecimento e aprendizado a mim proporcionado. Mais do que nunca tenho a certeza de que, no final, tudo é sobre “pessoas” e a influência delas em nossas vidas. Que tenhamos sempre com quem partilhar a caminhada.

Muito obrigada...

*Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos.*

*(Antoine de Saint-Exupéry)*



## RESUMO

Polímeros antimicrobianos possuem aplicações diversas, com destaque para a fabricação de embalagens ativas de alimentos e dispositivos biomédicos, o que impulsiona o desenvolvimento de novos materiais com esta propriedade. O acetato de celulose é um exemplo de polímero muito utilizado devido às suas características de biocompatibilidade, facilidade de obtenção e processamento, além de ser um polímero derivado da celulose, uma matéria-prima renovável. O acetato de geranila é um éster derivado do geraniol, que possui atividade antimicrobiana e propriedades térmicas de interesse. No presente trabalho filmes de acetato de celulose antimicrobianos foram obtidos pela com adição de 0,5% (v/v) e 1,0% (v/v) de acetato de geranila pela técnica de *casting*. A atividade antibacteriana dos filmes poliméricos foi avaliada pelas técnicas de difusão em meio sólido e contagem de microrganismos sobreviventes ao longo do tempo (curva de morte) para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* enquanto a atividade antifúngica foi atestada contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* por meio das referidas técnicas, considerando algumas adaptações para fungos. Os filmes antimicrobianos desenvolvidos apresentaram excelente atividade antibacteriana e boa atividade antifúngica, mostrando que a incorporação do acetato de geranila foi capaz de proporcionar a atividade antimicrobiana aos filmes de acetato de celulose obtidos. Também foi realizada a caracterização química (FTIR) e térmica (TGA, DSC) dos filmes poliméricos, sendo que a incorporação do acetato de geranila nos filmes de acetato de celulose pôde ser comprovada pelas referidas técnicas. Por meio das análises térmicas também foi possível observar dois eventos de degradação térmica exclusivos para os filmes com acetato de geranila, indicando que uma parcela do agente antimicrobiano fica provavelmente impregnado na matriz polimérica. Através dos ensaios mecânicos foi possível verificar que a adição do acetato de geranila não modificou significativamente o comportamento mecânico dos filmes de acetato de celulose quanto à rigidez e resistência à tração. Com o objetivo de atestar a possibilidade de uso do material desenvolvido também na área biomédica, foram realizados testes de biocompatibilidade *in vivo* por meio da implantação subcutânea dos filmes antimicrobianos em ratos Wistar imunocompetentes, e após 7 e 21 dias foram realizadas análises histológicas do tecido circundante ao implante, as quais mostraram que a adição do acetato de geranila nos filmes não causou nenhum dano ou reação tecidual atípica aos animais, não alterando a característica de biocompatibilidade do acetato de celulose. O teste de degradação hidrolítica mostrou que a variação da massa dos implantes durante 60 dias em solução fisiológica simulada (PBS) foi muito pequena, indicando que os filmes não tiveram perda de massa significativa com o passar do tempo, em PBS. A liberação do acetato de geranila em PBS também foi estudada, não sendo verificada a liberação de quantidades superiores a  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  durante os 60 dias de imersão dos filmes, sendo um indicativo de que a atividade antimicrobiana do material pode permanecer durante, no mínimo, este tempo. Estes resultados sugerem que o novo material polimérico desenvolvido é promissor para futuras aplicações em dispositivos biomédicos e em embalagens de alimentos.

**Palavras-chave:** Acetato de celulose antibacteriano; Acetato de celulose antifúngico; Acetato de geranila; Biocompatibilidade de acetato de celulose antimicrobiano.

## ABSTRACT

Antimicrobial polymers have several applications, highlight to obtain active food packaging and biomedical devices, which boosts the development of new materials with this property. Cellulose acetate is an example of widely used polymer due to its interesting characteristics such biocompatibility, easy to obtain and process, besides being a polymer derived from cellulose, a renewable raw material. Geranyl acetate is an ester derived from geraniol, which has antimicrobial activity and thermal properties of interest. In this work, antimicrobial cellulose acetate films were obtained for the first time with the addition of 0.5% (v/v) and 1.0% (v/v) of geranyl acetate by the casting technique. The antibacterial activity of the polymeric films was evaluated by the techniques of diffusion in solid medium and counting of surviving microorganisms over time (death curve) for the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, while the antifungal activity was attested against the fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* using the same techniques, considering some adaptations for fungi. The antimicrobial films showed excellent antibacterial activity and good antifungal activity, showing that the addition of geranyl acetate was able to provide antimicrobial activity to the cellulose acetate films. Chemical (FTIR) and thermal (TGA, DSC) characterizations of polymeric films were also performed, and the addition of geranyl acetate in cellulose acetate films was confirmed by the FTIR and TGA technique. Furthermore, through the thermal analysis, it was also possible to observe two thermal degradation events exclusive to the films with geranyl acetate, indicating that a part of the antimicrobial agent is probably entrapped in the polymeric matrix. Through the mechanical tests, it was possible to verify that the addition of geranyl acetate did not significantly change the mechanical behavior of the cellulose acetate films concerning stiffness and tensile strength. In order to study the possibility of using the developed material also in the biomedical area, *in vivo* biocompatibility tests were performed by the subcutaneous implantation of antimicrobial films in immunocompetent Wistar Rats, and after 7 and 21 days the histological analyzes of the tissue surrounding the implant were performed, which showed that geranyl acetate did not cause any damage or atypical tissue reaction in the animals, not altering the biocompatibility characteristic of antimicrobial cellulose acetate. The hydrolytic degradation test showed that the mass variation of implants during 60 days in phosphate-buffered saline (PBS) was very small, indicating that the films did not have significant mass loss over time, in PBS. Finally, the study of geranyl acetate release in PBS was also studied, with a release of less than  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  during the 60 days of immersion, which can indicate that the antimicrobial activity of the films can remain over time. These results suggest that the new polymeric material developed is promising for future applications in biomedical devices and food packaging.

**Keywords:** Antibacterial cellulose acetate; Antifungal cellulose acetate; Geranyl acetate; Biocompatibility of antimicrobial cellulose acetate.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do acetato de celulose.....	34
Figura 2. Estrutura química do acetato de geranila. ....	38
Figure 3.1 Results obtained with the death curve test for the polymeric films containing 0% (control) and 0.5% geranyl acetate for (a) <i>Staphylococcus aureus</i> and (b) <i>Escherichia coli</i> ...	53
Figure 3.2 Results obtained with the analysis of the growth of the fungus <i>Aspergillus niger</i> on the surface of the polymeric films; (a) 0% (control), (b) 0.5% and (c) 1.0% of geranyl acetate. ....	56
Figure 4.1 Microbiological results obtained from the diffusion tests for the cellulose acetate film and for the cellulose acetate films with different percentage of geranyl acetate against <i>Staphylococcus aureus</i> : (a) cellulose acetate film (control), (b) cellulose acetate film with 0.5 v% of geranyl acetate and (c) cellulose acetate film with 1.0 v% of geranyl acetate.....	68
Figure 4.2 Microbiological results obtained from the diffusion tests for the cellulose acetate film and for the cellulose acetate films with different percentage of geranyl acetate against <i>Escherichia coli</i> : (a) cellulose acetate film (control), (b) cellulose acetate film with 0.5 v% of geranyl acetate and (c) cellulose acetate film with 1.0 v% of geranyl acetate.....	68
Figure 4.3 Microbiological results with <i>Aspergillus flavus</i> fungus growth, (a) on the surface of the cellulose acetate films, (b) on the surface of cellulose acetate films with 0.5 v% of geranyl acetate and (c) on the surface of cellulose acetate films with 1.0 v% of geranyl acetate.....	71
Figure 4.4 SEM images obtained for surface of the cellulose acetate films. (a) Cellulose acetate film, (b) cellulose acetate film with 0.5 v% of geranyl acetate and (c) cellulose acetate film with 1.0 v% of geranyl acetate. ....	73
Figure 4.5 DSC thermogram obtained for the cellulose acetate films (CA) and for the cellulose acetate films with 0.5 v% (CA/0.5%GA) and 1.0 v% (CA/1.0%GA) of geranyl acetate. (a) Second heating, (b) first cooling and (c) derivative of DSC second heating. ....	74
Figure 4.6 (a) Thermogravimetric curves and (b) derivative thermogravimetric curves for the cellulose acetate films (CA) and for the cellulose acetate films with 0.5 v% (CA/0.5%GA) and 1.0 v% (CA/1.0%GA) of geranyl acetate. ....	77
Figure 4.7 FTIR spectrums obtained for the cellulose acetate films (CA) and for cellulose acetate films with 0.5 v% (CA/0.5%GA) and 1.0 v% (CA/1.0%GA) of the geranyl acetate. (a) wavenumber range of 4000 to 600 $\text{cm}^{-1}$ , wavenumber range of (b) 4000 to 2200 $\text{cm}^{-1}$ and wavenumber range of (c) 2200 to 600 $\text{cm}^{-1}$ .....	81

Figure 4.8 Mechanical properties for the cellulose acetate films (CA) and for the cellulose acetate films with 0.5 v% (CA/0.5%GA) and 1.0 v% (CA/1.0%GA) of geranyl acetate. (a) Tangent Modulus and (b) Tensile strength.....	83
Figure 5.1 Films implantation in rats; (A) skin removal; (B) biomaterial implantation; (C) rat in recuperation after surgical procedure.....	102
Figure 5.2 Comparison between histopathological examinations obtained for cellulose acetate implants collected on days 7 and 21 after surgical implantation.....	111
Figure 5.3 Implants removed of tissue after 21 days of implantation; (A) Implants with 0.0% (control), 0.5% and 1.0% (v/v) of GA; (B) Detail of 0.5% (v/v) implant; (C) Measure of implant. ....	114
Figure 5.4 Mass of samples films on the hydrolytic degradation test. ....	115
Figure 5.5 SEM micrographs obtained for surface of the samples submitted to the degradation test after 60 days of immersion in the PBS solution. (A) CA Implants without GA (control), (B) CA with 0.5% (v/v) of GA and (C) CA with 1.0% (v/v) of GA. ....	117

## LISTA DE TABELAS

Table 3.1 Bacterial count for the different times sampled in the death curve test for the polymeric films.....	54
Table 3.2 Percentage of reduction in bacterial count after 1 hour of contact with polymeric films.....	54
Table 3.3 Growth rating for the fungus <i>Aspergillus niger</i> on the polymeric films. ....	56
Table 4.1 Inhibition halo diameter obtained by the cellulose acetate films and cellulose acetate films with 0.5 v% and 1.0 v% of geranyl acetate from the diffusion test against the bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Escherichia coli</i> .....	69
Table 4.2 Thermogravimetric analysis data of cellulose acetate films.....	78
Table 5.1 Description of the scores used to quantify the infiltrate in the superficial dermis of the implant area.....	104
Table 5.2 Results of histological analysis of the rats' subcutaneous tissue 7 or 21 days after the implantation of control material or films containing 0.5% or 1.0% v/v of GA.....	111
Table 5.3 Percentage (%) of mass loss in polymeric film implants on the hydrolytic degradation test.....	116
Table 5.4 Results for the amount of GA released of CA polymeric films after 60 days.....	118

## LISTA DE FÓRMULAS QUÍMICAS E SIGLAS

CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono/Gás carbônico
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
FDA	<i>Food And Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NPs-Cu	Nanopartículas de cobre
NPs-ZnO	Nanopartículas de óxido de zinco
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCL	Policaprolactona
PEEK	Poli (éter-éter-cetona)
PEG	Polietilenoglicol
PET	Polietileno tereftalato
PHA	Poli (hidroxi alcanoato)
PHMB	Polihexametileno biguanida
PLA	Poli (ácido lático)
PMMA	Polimetilmetacrilato
PTFE	Politetrafluoretileno
PVA	Acetato de polivinila
STMP	Trimetafosfato de sódio
TGA	Análise de Termogravimetria
TiO <sub>2</sub>	Dióxido de titânio
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UHMWPE	Polietileno de Ultra Alto Peso Molecular
UV	Ultravioleta
ZnO	Óxido de zinco

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BC	Celulose bacteriana
BO	Bentonita organofílica
BTEAC	Benzil trietilamônio
AC-SB	Extratos de semente de Butia
AC-PB	Extratos de polpa de Butia
CEO	Óleo essencial de cravo-da-índia
FEO	Óleo essencial de erva-doce
CF	Fibra de carbono
CS	Quitosana
HA/HAp	Hidroxiapatita
MCs	Microcápsulas
OE	Óleo essencial
OEO	Óleo essencial de orégano
P	Pululano
TQ	Timoquinona

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>20</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
1.1 OBJETIVOS .....	23
1.1.1 <b>Objetivo Geral</b> .....	<b>23</b>
1.1.2 <b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>23</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>24</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>24</b>
2.1 MATERIAIS POLIMÉRICOS BIODEGRADÁVEIS.....	24
2.2 MATERIAIS POLIMÉRICOS BIOCAMPATÍVEIS .....	26
2.3 MATERIAIS POLIMÉRICOS ANTIMICROBIANOS .....	31
2.4 ACETATO DE CELULOSE.....	33
<b>2.4.1 Membranas/filmes poliméricos de acetato de celulose</b> .....	<b>34</b>
2.5 ACETATO DE GERANILA .....	38
2.6 ESTADO DA ARTE .....	41
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>48</b>
3.1 INTRODUCTION .....	48
3.2 METHODOLOGY .....	50
<b>3.2.1 Films preparation</b> .....	<b>50</b>
<b>3.2.2 Films antimicrobial analysis</b> .....	<b>51</b>
3.2.2.1 <i>Evaluation of bacterial growth inhibition on the films surface</i> .....	51
3.2.2.2 <i>Evaluation of fungi growth inhibition on the films surface</i> .....	51
3.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	52
<b>3.3.1 Evaluation of bacterial growth inhibition on the films surface</b> .....	<b>52</b>
<b>3.3.2 Evaluation of fungi growth inhibition on the films surface</b> .....	<b>55</b>
3.4 CONCLUSION .....	57
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>62</b>



4.1	INTRODUCTION .....	62
4.2	MATERIALS AND METHODS .....	64
<b>4.2.1</b>	<b>Films preparation .....</b>	<b>64</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Films antimicrobial analysis .....</b>	<b>65</b>
4.2.2.1	<i>Antibacterial activity .....</i>	65
4.2.2.2	<i>Antifungal activity.....</i>	65
<b>4.2.3</b>	<b>Films microstructure .....</b>	<b>66</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Thermal Behavior .....</b>	<b>66</b>
<b>4.2.5</b>	<b>FTIR analysis .....</b>	<b>66</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Mechanical tests .....</b>	<b>67</b>
4.3	Results and Discussions.....	67
<b>4.3.1</b>	<b>Antimicrobial analysis.....</b>	<b>67</b>
4.3.1.1	<i>Antibacterial activity .....</i>	67
4.3.1.2	<i>Antifungal activity.....</i>	71
<b>4.3.2</b>	<b>Films morphology .....</b>	<b>73</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Thermal Behavior .....</b>	<b>74</b>
4.3.3.1	<i>Differential scanning calorimeter (DSC) .....</i>	74
4.3.3.2	<i>Thermogravimetric analysis (TGA) .....</i>	76
<b>4.3.4</b>	<b>Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR characterization .....</b>	<b>80</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Mechanical properties .....</b>	<b>82</b>
4.4	CONCLUSION .....	85
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>		<b>97</b>
5.1	INTRODUCTION .....	98
5.2	MATERIAL AND METHODS.....	101
<b>5.2.1</b>	<b>The cellulose acetate implants .....</b>	<b>101</b>
<b>5.2.2</b>	<b>The animals .....</b>	<b>101</b>
<b>5.2.3</b>	<b>The implant of the Cellulose Acetate Films.....</b>	<b>101</b>

<b>5.2.4</b>	<b>Tissue Removal .....</b>	<b>103</b>
<b>5.2.5</b>	<b>Histological Analysis.....</b>	<b>103</b>
<b>5.2.6</b>	<b>Degradation Test - Hydrolytic Degradation.....</b>	<b>106</b>
<b>5.2.7</b>	<b>Geranyl Acetate Release.....</b>	<b>107</b>
<b>5.2.8</b>	<b>Statistical Analysis.....</b>	<b>107</b>
<b>5.3</b>	<b>RESULTS AND DISCUSSIONS .....</b>	<b>107</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Implantation of Cellulose Acetate Films.....</b>	<b>109</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Biocompatibility and cell infiltration in cellulose acetate films implant .....</b>	<b>109</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Implants characteristics after degradation .....</b>	<b>113</b>
<b>5.3.4</b>	<b>Degradation Test - Hydrolytic Degradation.....</b>	<b>114</b>
<b>5.3.5</b>	<b>Surface morphology of the CA films.....</b>	<b>117</b>
<b>5.3.6</b>	<b>Geranyl Acetate Release.....</b>	<b>118</b>
<b>5.4</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>119</b>
	<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>132</b>
	<b>CAPÍTULO 7.....</b>	<b>137</b>
	<b>CAPÍTULO 8.....</b>	<b>139</b>
	<b>CAPÍTULO 9.....</b>	<b>140</b>

## APRESENTAÇÃO DO DOCUMENTO

Este documento está organizado em 9 capítulos. No Capítulo 1 é apresentada a introdução ao tema de tese, com a descrição da motivação para o estudo, o objetivo geral e os objetivos específicos para a pesquisa. No Capítulo 2 é apresentada uma breve revisão da literatura, a qual contempla os principais conceitos teóricos necessários para desenvolvimento da tese, bem como estudos acerca do estado da arte do tema, fundamentado em recentes publicações de periódicos científicos.

Os Capítulos 3, 4 e 5 são apresentados na forma de artigos científicos, os quais foram elaborados durante as etapas da pesquisa e descrevem de forma detalhada a metodologia e os resultados obtidos durante o desenvolvimento da tese. O primeiro está publicado, enquanto os demais estão submetidos e no processo de revisão em periódicos científicos.

No Capítulo 3 é apresentado o artigo que explora a capacidade dos filmes de acetato de celulose atuarem como material antimicrobiano por meio da incorporação do éster acetato de geranila. Este capítulo é baseado no artigo intitulado “*Antimicrobial cellulose acetate films by incorporation of geranyl acetate for active food packaging application*”, publicado no periódico *Research, Society and Development* (Vol 11 (1), 2022). Neste estudo preliminar foi apresentado uma proposta de obtenção de filmes poliméricos de acetato de celulose por meio da incorporação do acetato de geranila, com o objetivo de verificar se a propriedade antimicrobiana deste éster seria manifestada nos filmes. Os resultados mostraram a excelente atividade antibacteriana e antifúngica dos filmes de acetato de celulose desenvolvidos, nos quais o crescimento microbiano na superfície foi significativamente reduzido quando o acetato de geranila foi adicionado. Este resultado motivou a sequência do trabalho, impulsionando estudos mais detalhados do novo material antimicrobiano proposto, visando futuras aplicações para embalagens de alimentos e também na obtenção de dispositivos biomédicos.

No Capítulo 4 são descritas e discutidas as caracterizações dos filmes antimicrobianos desenvolvido, sendo estas apresentadas no artigo intitulado “*Cellulose acetate films with geranyl acetate: microbiological, thermal and mechanical performance*” submetido e, até o presente momento em avaliação, no periódico *Carbohydrate Polymers*. Neste trabalho, a atividade antimicrobiana dos filmes foi atestada pelo método de difusão em ágar e a caracterização dos filmes foi realizada, com especial atenção para as análises térmicas e mecânicas, as quais são indicadores muito importantes para futuras aplicações do novo material polimérico. A incorporação do acetato de geranila ao acetato de celulose pôde ser comprovada,

sendo que a adição deste agente antimicrobiano proporcionou atividade antimicrobiana sem alterar significativamente as propriedades mecânicas de rigidez e de resistência máxima a tração dos filmes. Ainda, a incorporação do acetato de geranila também não modificou o comportamento térmico do acetato de celulose. Estes estudos proporcionaram resultados importantes para a aplicação futura do acetato de celulose antimicrobiano em trabalhos mais detalhados de caracterização e para a concepção de projetos com a sua aplicação na fabricação de embalagens de alimentos e de dispositivos biomédicos.

Por fim, no Capítulo 5 está apresentada e discutida a caracterização biológica dos filmes antimicrobianos de acetato de celulose com a incorporação de acetato de geranila. Os estudos foram realizados por meio de análises biológicas *in vivo* e *in vitro*, buscando estudar a biocompatibilidade dos filmes obtidos. Os resultados e discussões estão apresentados no artigo submetido e em avaliação no periódico *Biomaterials Advances*, com o título “***Biocompatibility of antimicrobial cellulose acetate polymeric films by incorporation of geranyl acetate ester***”. Com este estudo foi possível sinalizar que o novo material desenvolvido tem potencial aplicação para a área biomédica, pois quando implantados nos animais, os filmes não provocaram alterações histológicas atípicas nos tecidos. Ainda, por meio do teste de liberação, não foi verificada a migração do acetato de geranila para um meio fisiológico simulado em quantidades consideráveis, bem como não foram detectadas perda de massa significativas e nem sinais evidentes de degradação na superfície dos filmes, o que é um excelente resultado tendo em vista a necessidade de biomateriais antimicrobianos que mantenham sua característica estrutural com o passar do tempo.

De modo a fornecer um panorama geral do trabalho, no Capítulo 6 é apresentado uma compilação dos principais resultados obtidos nos três artigos supracitados. Finalmente, no Capítulo 7, são apresentadas as principais conclusões de tese, enquanto que no Capítulo 8 são abordadas as possibilidades para futuros trabalhos relacionados ao tema, com a discussão de algumas perspectivas e lacunas remanescentes, bem como evidenciando a contribuição científica desta tese. Por fim, no Capítulo 9, são apresentadas as referências científicas estudadas.

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO

Os materiais poliméricos têm sido amplamente estudados e aplicados para múltiplas finalidades devido às suas propriedades interessantes, como longa durabilidade, atoxicidade, baixo custo, facilidade de moldagem e a versatilidade de aplicação. A crescente demanda exige novas fontes desses materiais, que envolvam um fluxo produtivo de menor impacto ambiental e proporcionem a obtenção de polímeros com taxas de degradação mais elevadas, uma vez que o processo de degradação do plástico não biodegradável é extremamente lento, causando sérios problemas ambientais pelo seu acúmulo, aumentando os níveis de poluição do solo e dos cursos d'água. Desta forma, o uso de polímeros naturais e biodegradáveis vem ganhando espaço, se destacando em diversos segmentos (SCHAEFER et al., 2020).

Esta classe de polímeros representa uma oportunidade desafiadora, atraindo um interesse crescente no desenvolvimento de novos materiais que possam ser bons substitutos aos polímeros convencionais de base fóssil. Nesse contexto, o acetato de celulose surge como uma alternativa promissora, com interessantes propriedades. É um éster orgânico de baixo custo, oriundo da celulose, a qual está disponível de forma abundante e renovável. Apresenta boa estabilidade térmica e química, sendo utilizado para a obtenção de uma ampla gama de materiais, principalmente membranas e filmes, devido às suas excelentes propriedades mecânicas (JATOI; KIM; NI, 2019; SANTOS et al., 2021; ULLAH et al., 2021; VATANPOUR et al., 2022). Além disso, a biodegradação do acetato de celulose também tem sido investigada em alguns estudos, sendo avaliada a perda de massa do material polimérico sob certas condições de biodegradação e também a atividade dos microrganismos no processo degradativo, atestando que este material é, de fato, biodegradável (ISHIGAKI et al., 2000, MOSTAFA et al., 2018). Ainda, outra propriedade de elevado interesse é a biocompatibilidade apresentada por materiais de acetato de celulose, sendo esta característica comprovada em diferentes estudos, tanto com testes *in vitro* quanto *in vivo* (AZHAR et al., 2021; ULLAH et al., 2021).

Tais características fazem com que o acetato de celulose figure como um dos polímeros naturais mais estudados, com novas pesquisas nas linhas de aditivação e aplicação deste material, vinculando-o a diferentes propósitos. Diversos estudos têm sido realizados na área biomédica, onde o acetato de celulose é empregado para melhorar a osseointegração após

implante, na engenharia de tecidos e curativos (GOUMA et al., 2012; LIAO et al., 2015; LEI et al., 2022; PANDELE et al., 2017; PANDELE et al., 2018; SOFI et al., 2021; ULLAH et al., 2020; VATANKHAH et al., 2014; VOICU et al., 2016). Além disso, tais materiais podem ser aplicados no processo de hemodiálise (COROBEA et al., 2016; KEE; IDRIS, 2010; WAHEED, HUSSAIN, 2019) e para controlar a entrega de medicamentos (CASTILLO-ORTEGA et al., 2011; MIANEHRO, 2022; MILOVANOVIC et al., 2016; RODRIGUES FILHO et al., 2016). Outra tendência é o desenvolvimento de embalagens ativas de alimentos, um tipo especial de sistema que pode desempenhar um papel ativo na qualidade dos alimentos quando os embala, tendo como principais propósitos garantir a segurança, prolongar a vida de prateleira e preservar as características sensoriais dos produtos (ASSIS et al., 2021; DAIRI et al., 2019; DANNENBERG et al., 2017; PEREIRA et al., 2022).

A adição de substâncias antimicrobianas no acetato de celulose com intuito de incorporar esta propriedade nos materiais desenvolvidos também possui grande relevância, pois estes terão a capacidade de mitigar ou de eliminar a proliferação de agentes patógenos em sua superfície, o que é de extremo interesse, por exemplo, na área biomédica. Os implantes poliméricos antimicrobianos fazem com que os microrganismos tenham dificuldade em colonizar suas superfícies, prevenindo infecções (GOMAA et al., 2017; FARIA et al., 2022), enquanto o curativo antimicrobiano pode auxiliar no processo de cicatrização e também na redução de infecções, pois os microrganismos podem facilmente penetrar e formar infecções nas feridas levando ao retardo do processo de cicatrização e ou até mesmo causando a morte, portanto, o material antimicrobiano desempenha um papel importante na melhoria do estado de saúde do paciente (ESMAEILI et al., 2020).

A obtenção de materiais poliméricos antimicrobianos destaca-se também na área de alimentos, quando se deseja obter embalagens ativas as quais consigam reduzir ou até mesmo eliminar o crescimento de fungos e bactérias, estendendo a vida de prateleira dos alimentos, minimizando o desperdício e também evitando a propagação de doenças vinculadas ao consumo de alimentos contaminados (GLICERINA et al., 2021, KREPKER et al., 2017).

A atividade antimicrobiana pode ser agregada a materiais poliméricos de acetato de celulose através da incorporação de diferentes agentes antimicrobianos, destacando-se nanopartículas metálicas de prata, zinco e cobre (AL-SAEEDI et al., 2021; ALY; AHMED, 2021; ESMAEILI et al., 2020; SOFI et al., 2021). Entretanto, a maioria dos métodos de síntese destas nanopartículas envolvem o uso de reagentes químicos potencialmente perigosos a saúde

humana e ao meio ambiente, sendo que a presença destas nanopartículas sintetizadas, mesmo que em baixas concentrações, pode torná-las inadequadas para determinadas aplicações (AUGUSTINE; HASAN, 2020). Ainda, as nanopartículas tendem a formar aglomerados e dificultar a sua homogeneização na matriz da maioria dos polímeros comerciais, o que promove regiões sem a atividade antimicrobiana nos produtos (CAPELEZZO et al., 2018).

Compostos naturais como extratos e óleos naturais também são muito estudados como agentes antimicrobianos a serem incorporados em materiais poliméricos de acetato de celulose (EL FAWAL; OMER; TAMER, 2019; MOREIRA GONÇALVES et al., 2020; PEREIRA et al., 2022; POLA et al., 2016; SANTOS et al., 2021; ULLAH et al., 2021), sendo que estes estudos relatam a manifestação da atividade antimicrobiana no acetato de celulose e a fácil compatibilização e dispersão dos óleos naturais nas matrizes poliméricas. Entretanto, estes compostos são muito voláteis e apresentam elevada sensibilidade frente à fatores externos, como o calor, a umidade e a luz (KREUTZ et al., 2021; LIMA REIS et al., 2020), o que pode motivar a degradação/liberação destes compostos da matriz polimérica com o decorrer do tempo, fazendo com que o produto perca a sua atividade antimicrobiana, o que pode não ser interessante em algumas aplicações.

Desta maneira, é evidente a necessidade de desenvolver materiais poliméricos antimicrobianos de acetato de celulose por meio da incorporação de novos agentes antimicrobianos, os quais sejam capazes de superar os inconvenientes apresentados pelas substâncias comumente utilizadas, citados anteriormente. O desafio consiste em definir um agente antimicrobiano que seja compatível com a matriz polimérica do acetato de celulose e promova a característica antimicrobiana ao material desenvolvido, sem comprometer as propriedades típicas e desejáveis do acetato de celulose, como biocompatibilidade, além de não afetar sua estabilidade térmica.

Neste cenário, o acetato de geranila surge como uma boa opção de agente antimicrobiano para o acetato de celulose. É um éster oriundo do geraniol que pode ser obtido por síntese química (ZEFERINO et al., 2021) ou enzimática (BOURKAIB et al., 2018; MURCIA et al., 2018), apresentando excelente atividade antibacteriana e antifúngica (İŞCAN, 2017; ZEFERINO, 2022) e boa estabilidade térmica, além de apresentar baixa toxicidade (ZEFERINO, 2022), estando inclusive presente na lista de alimentos aptos para consumo humano, reconhecido como seguro pela *Food And Drug Administration* (FDA, 2022).

Ademais, é importante salientar que não foram encontrados relatos científicos de incorporação de um éster puro em uma matriz polimérica natural. Também não se tem conhecimento de estudo desenvolvido aplicando o éster acetato de geranila como agente antimicrobiano em polímeros, o que reforça o ineditismo da tese e evidencia a gama de oportunidade de trabalho para este novo material. Logo, de encontro ao exposto, o presente trabalho propõe a obtenção de um novo material antimicrobiano de acetato de celulose na forma de filme, por meio da incorporação do éster acetato de geranila, sendo avaliadas as características desse novo material considerando futuras aplicações na área de embalagem de alimentos e biomédica.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Obter filmes de acetato de celulose com propriedade antibacteriana e antifúngica pela incorporação de acetato de geranila.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer um procedimento para a obtenção de filmes antimicrobianos de acetato de celulose contendo acetato de geranila;
- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos filmes de acetato de celulose produzidos com diferentes concentrações de acetato de geranila;
- Realizar a caracterização química dos filmes antimicrobianos obtidos;
- Avaliar o efeito da incorporação do acetato de geranila nas propriedades térmicas e mecânicas dos filmes;
- Estudar a biocompatibilidade dos filmes antimicrobianos;
- Avaliar a capacidade de degradação *in vitro* dos filmes antimicrobianos;
- Avaliar a liberação do acetato de geranila para um meio fisiológico simulado.



## CAPÍTULO 2

### 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo tem como intuito abordar os principais conceitos disponíveis na literatura sobre o tema do presente trabalho, com destaque para os materiais poliméricos (biodegradáveis, biocompatíveis e antimicrobianos), abordando em especial o acetato de celulose e o acetato de geranila, componentes do novo material antimicrobiano desenvolvido na presente tese. Também se encontra apresentado neste capítulo o estado da arte relacionado à obtenção de materiais poliméricos antimicrobianos de acetato de celulose com aplicação biomédica e em embalagens ativas de alimentos, que configuram o foco de aplicação futura do material desenvolvido na presente tese.

#### 2.1 MATERIAIS POLIMÉRICOS BIODEGRADÁVEIS

A demanda global por energia, produtos químicos e por novos materiais tem aumentado à medida que a população mundial aumenta, sendo que a maioria destes componentes são derivados de recursos fósseis, incluindo os materiais poliméricos, que respondem por cerca de 8% do consumo total desta fonte, devendo este número aumentar para 20% até 2050 (WANG; GANEWATTA; TANG, 2019). Além destes recursos estarem esgotando, o seu uso promove um impacto negativo no meio ambiente. Já está acordado pela comunidade científica que o efeito estufa se deve principalmente ao processamento dos combustíveis fósseis, além das ações de destruição de áreas verdes para fins de construção ou para o desenvolvimento industrial (JAHWARI; PERVEZ, 2019).

Este contexto, associado com a dificuldade de descarte dos produtos fabricados com polímeros convencionais, evidencia um grave impacto para o meio ambiente. Os produtos não biodegradáveis necessitam de longos períodos para a sua degradação, contribuindo para o acúmulo de lixo e para a desestabilização dos ecossistemas naturais, o que vem gerando preocupações crescentes e de escala global por várias lideranças governamentais, repensando a maneira de se produzir e de se tratar estes materiais após seu uso (CASARIN et al., 2013; RAZA et al., 2020).

Desta forma, há um interesse significativo no uso da biomassa natural renovável como recurso bruto para o desenvolvimento de materiais poliméricos sustentáveis, pois os mesmos apresentam a vantagem de reduzir o impacto no meio ambiente, especialmente as emissões de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Isso acontece em virtude de que a fonte da maioria destes biopolímeros é a agricultura, que equilibra as emissões desse gás, pois o ciclo de crescimento da matéria-prima dos mesmos remove CO<sub>2</sub> da atmosfera (AL-JAHWARI; PERVEZ, 2020; WANG; GANEWATTA; TANG, 2019).

Essa substituição de matérias-primas fósseis por alternativas renováveis pode, ainda, contribuir para a geração de materiais mais adequados para a reciclagem e também que sejam biodegradáveis (ZHU; ROMAIN; WILLIAMS, 2016). A biodegradação de polímeros envolve a clivagem hidrolítica ou enzimática de ligações no polímero, sendo frequentemente definida como um evento que ocorre através da ação de enzimas e /ou decomposição química associada a organismos vivos (bactérias, fungos, etc.). Ainda, outros processos como fotodegradação, oxidação e hidrólise também podem ter impacto na estrutura e nas cadeias dos polímeros antes e/ou durante a biodegradação (ZHONG et al., 2020).

Avérous e Boquillon (2004) classificaram os polímeros biodegradáveis de acordo com a sua obtenção. Conforme sugeriram os autores, existem quatro fontes de polímeros biodegradáveis, sendo eles: polímeros oriundos de biomassa, tais como os polímeros obtidos a partir de recursos agrícolas (por exemplo, amido ou celulose); polímeros oriundos do metabolismo microbiano, tais como os poli (hidroxi alcanos) (PHAs); polímeros convencionalmente e quimicamente sintetizados a partir de monômeros provenientes de recursos agrícolas, por exemplo, o poli (ácido lático) (PLA) e polímeros biodegradáveis obtidos a partir de fontes fósseis, como por exemplo o polímero comercial ecoflex<sup>®</sup>.

O principal desafio da adoção de polímeros biodegradáveis como substituto dos polímeros convencionais consiste na instabilidade térmica apresentada por estes materiais, mesmo que em temperaturas relativamente baixas, além da baixa resistência mecânica (JAHWARI; PERVEZ, 2019). Em virtude disso, alguns elementos têm sido adicionados nas matrizes poliméricas de materiais biodegradáveis, com o intuito de superar estas limitações (CHEN et al., 2010; GU et al., 2018; SHANKAR, WANG, RHIM, 2018), aumentando a possibilidade de aplicação com intuito de deixar estes materiais ainda mais competitivos frente aos polímeros convencionais.

No entanto, ainda existem muitas aplicações, especialmente no setor biomédico, onde os polímeros biodegradáveis são considerados termicamente estáveis com resistência mecânica aceitável, além de possuir uma biocompatibilidade excelente, o que impulsiona diversas pesquisas na área biomédica a fazerem uso destes materiais (JAHWARI; PERVEZ, 2019; WANG; GANEWATTA; TANG, 2019).

Ainda, outra propriedade interessante dos polímeros biodegradáveis é que eles podem receber algumas substâncias específicas, tais como agentes antioxidantes, antifúngicos, antibacterianos e pigmentos devido a sua estrutura química, o que permite modificações e proporciona novas funcionalidades para estes materiais, motivo pelo qual muitas pesquisas de obtenção de películas poliméricas estão sendo guiadas utilizando esta classe de materiais como base (ZHANG et al., 2017; SABHARWAL; CHATTOPADHYAY; SINGH, 2018).

## 2.2 MATERIAIS POLIMÉRICOS BIOCAMPATÍVEIS

Os materiais biocompatíveis podem ser definidos como materiais que interagem com tecidos ou órgãos humanos de uma maneira que permita sua funcionalidade total ou parcial relacionada à sua compatibilidade superficial e estrutural, sendo que a primeira se refere ao grau de adaptação do material às características biológicas, químicas e da superfície, enquanto a compatibilidade estrutural considera à aceitação do comportamento mecânico do material (AXINTE et al., 2019).

A escolha de um biomaterial depende da sua aplicação, sendo que este deve passar por diferentes testes para que seja considerado adequado para a finalidade pretendida. Neste sentido, destacam-se propriedades biológicas, como a biocompatibilidade, com frequência associada à hemocompatibilidade, citotoxicidade, alergenicidade, estimulação de adesão e proliferação celular, além de propriedades físicas, propriedades mecânicas e propriedades químicas (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Além da característica elementar de não induzir inflamação, reações alérgicas ou toxicidade, é indicado que os biomateriais apresentem características como por exemplo, bioinercia e capacidade de ser esterilizável e ainda, apresentar propriedades mecânicas adequadas para a utilização pretendida. É importante ressaltar que, quando se insere um biomaterial em um organismo vivo, é natural que uma resposta imune contra esse material aconteça, desencadeada pelo sistema imunológico do organismo hospedeiro. Portanto, sempre

haverá inflamação no local de implante do biomaterial devido a rompimentos de tecido e vasculares, porém, o tipo da resposta, sua duração e a intensidade dependerão das características físico-químicas de cada biomaterial e precisam ser investigadas (DOS SANTOS; BRANDALISE; SAVARI, 2017; KALABA et al., 2016; SANTOS; MARINHO; MIGUEL, 2013).

É preciso estar atento a uma infinidade de interações que podem ocorrer entre o material e o organismo vivo, incluindo interações do material com o sangue do hospedeiro e estresse oxidativo provocado pelo material, o qual é estranho ao organismo receptor. Também existe a possibilidade de infecções decorrentes do processo cirúrgico de implantação deste material, as quais precisam ser observadas. Na inflamação provocada por biomateriais, citocinas e quimiocinas geram espécies reativas de oxigênio que prejudicam as funções celulares normais por meio de danos ao DNA, proteínas e lipídeos (KALABA et al., 2016).

Logo, é de extrema importância que a inserção de um biomaterial seja estudada em detalhes, garantindo a biocompatibilidade entre ele e o organismo vivo. A normativa ISO 10993 regulamenta os ensaios necessários para a avaliação da biocompatibilidade de materiais, indicando ensaios *in vitro* e *in vivo* para este fim, sendo o ensaio de implantação (*in vivo*) comumente realizado para materiais poliméricos que visam aplicações biomédicas.

Os materiais biocompatíveis são utilizados na obtenção dos *scaffolds* – estruturas que atuam como matrizes para o crescimento celular, fornecendo um ambiente estável, auxiliando a remodelagem dos tecidos (MCMAHON et al., 2018; ASADI et al., 2019). Segundo Asadi et al. (2019), estas estruturas devem imitar a matriz extracelular no aspecto morfológico, bioquímico e mecânico para melhorar a adesão, proliferação e diferenciação celular, apresentando propriedades como biocompatibilidade, taxa de degradação ajustável com produtos de degradação não tóxicos, boa porosidade para o transporte de nutrientes e resíduos, semelhança com a estrutura do tecido alvo e resistência mecânica apropriada.

Geralmente, os tecidos são agrupados em tecidos duros (por exemplo, ossos e dentes) e tecidos moles (por exemplo, pele, vasos sanguíneos, cartilagem e ligamentos). Logo, estes biomateriais têm como objetivo complementar ou substituir as funções destes tecidos vivos do corpo humano, podendo ser de origem natural ou artificial. É usual agrupá-los em quatro grandes grupos, sendo eles (i) metais, (ii) cerâmica, (iii) polímeros e (iv) compósitos feitos a partir de várias combinações de (i), (ii) e (iii). Em geral, os tecidos duros, conforme sugere o próprio nome, são mais rígidos e mais fortes quando comparados aos tecidos moles, portanto,

considerando a compatibilidade estrutural, metais ou cerâmica são os materiais convencionalmente escolhidos para aplicações em tecidos duros enquanto polímeros são os eleitos para aplicações em tecidos moles (RAMAKRISHNA et al., 2001).

Entretanto, nos últimos anos, os polímeros têm apontado como um material promissor também para reconstituição de tecidos ósseos, principalmente quando combinados com outros materiais, formando compósitos poliméricos. Se comparados aos materiais metálicos, os implantes à base de polímeros exibem propriedades superiores de corrosão e fadiga, oferecendo a vantagem de não liberar íons metálicos no corpo (AXINTE et al., 2019).

Por exemplo, Deng et al. (2015) prepararam um composto polimérico de poli(éter-éter-cetona)/nano-hidroxiapatita/fibra de carbono (PEEK/n-HA/CF), com intuito de obter um material potencial para ser aplicado como reparador ósseo. O compósito foi preparado motivado pelo fato de que a PEEK pura não apresenta uma osseointegração adequada. Os resultados obtidos pelos autores indicaram que a adesão, proliferação e diferenciação osteogênica das células, bem como as propriedades mecânicas, foram melhoradas para o biocompósito PEEK/n-HA/CF se comparados com a matriz de PEEK pura. Ainda, o novo material aumentou a bioatividade *in vivo* e a osseointegração avaliada em modelos de dentes caninos. Assim, o biocompósito ternário PEEK/n-HA/CF com desempenho mecânico e biológico aprimorado apresentou grande potencial como material de implante bioativo para aplicações odontológicas e ortopédicas.

Em outro estudo, Macuvele et al., (2019) estudaram um compósito polimérico de polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE) e hidroxiapatita (HA) adicionado com bentonita organofílica (BO), com o intuito de melhorar o desempenho mecânico deste material, pois o composto UHMWPE/HA apresenta limitações em sua utilização para aplicações na engenharia de tecidos duros devido à formação de aglomerados e defeitos microestruturais. Os resultados obtidos para o novo compósito sugerem que a adição de 10% em peso de BO melhorou a interface entre o UHMWPE e a HA, apresentando melhoras consideráveis nas propriedades mecânicas do material. O compósito UHMWPE/HA/BO-10% em massa apresentou baixa absorção de água e induziu o crescimento de cristais de apatita em sua superfície. Além disso, os testes de hemocompatibilidade sinalizaram que este novo material é promissor para aplicação na engenharia de tecidos ósseos.

Outros materiais poliméricos também têm sido usados como base de estudo para materiais biocompatíveis, como, por exemplo, polietileno tereftalato (PET) (SILVA et al.,

2019), polimetilmetacrilato (PMMA) (GAO et al., 2019) e politetrafluoretileno (PTFE) (WANG et al., 2019) os quais apresentaram propriedades mecânicas interessantes para reparação de tecidos duros. Ainda, polímeros biodegradáveis e/ou biopolímeros também estão sendo estudados para esta finalidade (CHEN et al., 2010; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ et al., 2019). Segundo Hassan et al. (2019), quando presente no corpo humano, os biopolímeros degradam-se de maneira controlada, produzindo componentes não tóxicos, o que impulsiona o seu uso na engenharia de tecidos.

Por exemplo, em estudo realizado por Hassanajili et al. (2019), os autores utilizaram a abordagem indireta da impressão 3D para desenvolver estruturas ósseas a partir de compósitos poliácido láctico/policaprolactona/hidroxiapatita (PLA/PCL/HA), variando a porcentagem de HA. Foram realizadas diversas avaliações morfológicas e químicas dos compósitos, além de ensaios mecânicos, sendo que os resultados apontaram que o aumento da HA resultou em diminuição da porosidade e aumento do módulo de compressão, enquanto os materiais ricos em PLA apresentaram maior módulo de compressão do que as amostras ricas em PCL. Os ensaios de compatibilidade biológica foram realizados pelos autores para os compósitos PLA/PCL/HA nas proporções PLA/PCL de 70/30, 50/50 e 30/70 e a quantidade fixa de HA (35%). Os resultados indicaram que o *scaffold* composto com a razão de peso PLA/PCL de 70/30 obteve propriedades mais favoráveis em termos de biocompatibilidade, e osteoindução.

Em outro estudo, Atila, Keskin e Tezcaner (2016) prepararam compósitos à base de biopolímeros naturais o pululano (P) e o acetato de celulose (AC), dois polissacarídeos, os quais foram submetidos a eletrofiação em várias proporções P/AC (P80/AC20, P50/AC50 e P20/AC80 em percentuais) para desenvolver a rede fibrosa 3D. As estruturas foram reticuladas com trimetafosfato de sódio (STMP) para melhorar as propriedades mecânicas. A morfologia das fibras de P50/AC50 apresentou-se mais uniforme, não promovendo a separação de fases; ainda, esse material foi reticulado com mais eficiência se comparado aos demais. Verificou-se que as propriedades mecânicas de P20/AC80 e P50/AC50 foram superiores às do P80/AC20. Entre todos os grupos, o material cuja composição era de P50/AC50 reticulado apresentou poros mais uniformes, portanto, esse grupo foi utilizado para estudos de bioatividade, apresentando resultados positivos. Em suma, o compósito com a formulação P50/AC50 reticulado apresentou melhor desempenho que os demais, sendo propostos como candidatos para aplicações de engenharia de tecido ósseo.

Ainda, biopolímeros também estão sendo estudados para reintegração de tecidos moles, como por exemplo, em trabalho realizado por Albanna et al. (2012), que investigaram a melhoria da resistência mecânica de *scaffolds* de quitosana por meio da utilização de um reforço de fibras deste mesmo material. Os resultados obtidos pelos autores mostraram que a incorporação de fibras melhorou a resistência e a rigidez do *scaffold* em proporção à razão de massa de fibra/*scaffold*, sendo que as propriedades mecânicas dos *scaffolds* reforçados aproximaram-se das propriedades das válvulas aórticas humanas, o que credencia este material como potencial candidato à aplicação na engenharia de tecidos moles.

Em outro trabalho, Yang et al. (2019) utilizaram PLA como a matéria-prima polimérica para desenvolvimento de um dispositivo impresso em 3D para reconstrução pancreatoentérica em mini-porcões, obtendo excelentes resultados, pois os exames histológicos indicaram que os tecidos eram contínuos entre o pâncreas e o jejuno, sendo que o uso deste novo dispositivo reduziu o tempo e os procedimentos de operação e não manifestou reação inflamatória óbvia.

Outra aplicação interessante para os materiais biocompatíveis é na obtenção de curativos; feridas na pele e úlceras causadas por traumas térmicos, cirurgias ou diabetes são a prevalência de problemas de saúde em todo o mundo. Quando a pele é danificada, seu papel protetor é comprometido e é necessário um curativo capaz de fornecer proteção e ajudar a restabelecer a pele, além de ser conveniente para uso, de modo a apresentar fácil manipulação e não causar sofrimento ao paciente (FLORES et al., 2017; HU et al., 2019).

Pesando nesta problemática, Colobatiu et al. (2019) investigaram a viabilidade do uso de uma formulação de filme de quitosana incorporado com compostos bioativos (uma mistura de extratos alcoólicos de diferentes plantas) como material de curativo funcional para feridas diabéticas. Foram realizados pelos autores ensaios *in vitro* para determinação da capacidade antioxidante, bem como o efeito dos filmes de quitosana na viabilidade celular. Além disso, o desempenho *in vivo* dos filmes foi avaliado usando um modelo de rato diabético induzido. Os autores perceberam que a formulação do filme de quitosana proporcionou um ambiente úmido benéfico para a ferida, reduzindo o risco de desidratação e favorecendo o fechamento das mesmas. Além disso, os filmes exibiram boa atividade antioxidante e biocompatibilidade adequada de acordo com os ensaios *in vitro*. A avaliação *in vivo* da formulação de filme de quitosana carregada de compostos bioativos confirmou que o biofilme estimulou a contração da ferida e acelerou o processo de cicatrização. Os resultados confirmam que o filme

desenvolvido pelos autores parece ser uma formulação promissora, bem como um potencial novo biomaterial a ser utilizado na cicatrização de feridas.

Em outro trabalho, Lei et al (2022) desenvolveram *scaffolds* de acetato de celulose com diferentes concentrações de Mesilato de Tirilazad (medicamento com efeito antioxidante) para promover a cicatrização de feridas diabéticas, sendo que o material produzido foi estudado sob diferentes perspectivas. Segundo os autores, os *scaffolds* incorporados com 3% (em massa) do medicamento apresentaram a maior proliferação celular e viabilidade celular sob condições normais e de estresse oxidativo. Portanto, essa concentração foi escolhida para o tratamento de feridas diabéticas. O experimento *in vivo* mostrou que a liberação do medicamento apresentou uma porcentagem significativamente maior de fechamento da ferida, espessura epitelial e deposição de colágeno em comparação com *scaffolds* sem o fármaco. Os resultados preliminares apresentados no estudo sugerem que os curativos de acetato de celulose carregados com Mesilato de Trilazad contribuíram na cicatrização de feridas diabéticas.

### 2.3 MATERIAIS POLIMÉRICOS ANTIMICROBIANOS

Uma tendência vem sendo estudada já faz alguns anos é a obtenção de polímeros antimicrobianos, alcançados por meio da incorporação de um agente antimicrobiano a uma matriz polimérica. Esse agente antimicrobiano pode ser sintético, como por exemplo, partículas ou nanopartículas de óxidos metálicos (ABREU et al., 2015; ASHFAQ; VERMA; KHAN, 2017; CAPELEZZO et al., 2018; XIE; HUNG, 2018) e antibióticos comerciais (KIM et al., 2018; SABHARWAL, CHATTOPADHYAY; SINGH, 2018), compostos naturais, como extratos e óleos essenciais (ARAÚJO et al., 2015; NOURI et al., 2018) ou ainda, uma mistura de ambos (SANI; PIRSA; TAĞI, 2019) de modo a aproveitar a sinergia entre estes compostos. A grande maioria destes trabalhos utiliza como base polímeros naturais e/ou biodegradáveis, em virtude da preocupação emergente com o meio ambiente, previamente relatada, o que demonstra uma tendência forte para a utilização desta classe de polímeros quando no desenvolvimento de novos materiais.

Polímeros antimicrobianos podem ser utilizados em diversas aplicações, sendo a mais comum delas voltada para a área de alimentos, quando estes materiais são precursores na obtenção de embalagens ativas (PRIYADARSHI et al., 2018) e também como películas



protetoras destes alimentos, podendo, inclusive, serem comestíveis (LICCIARDELLO et al., 2018).

Por exemplo, em estudo realizado por Capelezzo et al. (2018), os autores incorporaram compostos antimicrobianos sintéticos a um polímero biodegradável comercial. Foram utilizados 1 e 2% (m/m) de nanopartículas de óxido de zinco (NPs-ZnO) e 1 e 2% (m/m) de microcápsulas de vidro dopadas com zinco iônico (MCs) como aditivos incorporados ao Ecoflex<sup>®</sup> e testaram sua atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* através da análise de curva de morte bacteriana. Os autores concluíram que é possível optar pela concentração de 1% de qualquer um dos aditivos, visto que os resultados microbiológicos de inibição se mostraram estatisticamente semelhantes após 24 horas. Porém, dentre os aditivos utilizados, as MCs foram melhores dispersas na matriz polimérica se comparadas com as NPs-ZnO. Segundo os autores, os filmes desenvolvidos são promissores para o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis antimicrobianas para alimentos, sendo a próxima etapa do trabalho consistirá em utilizar estes filmes para a confecção de embalagens e realização de testes *in vivo*, de modo a verificar se a atividade antimicrobiana apresentada pelo material desenvolvido é mantida quando o mesmo é utilizado para acondicionar alimentos, promovendo uma melhora na qualidade e estendendo a vida útil do produto que está embalando sem afetar a biodegradabilidade do material.

Em outro estudo, Ahmed et al. (2010) avaliaram uma nanoembalagem antimicrobiana para aplicação em alimentos, incorporando nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) e óleo essencial de cravo-da-índia (CEO) em um filme polimérico contendo uma mistura de poli(ácido láctico)/polietilenoglicol/ policaprolactona (PLA/PEG/PCL). Os filmes desenvolvidos foram caracterizados por análises térmicas, reológicas, mecânicas, estruturais e microbiológicas. Ensaio reológico no estado fundido revelaram que o reforço de ZnO reduziu significativamente os módulos dinâmicos, acelerando a degradação do polímero, porém, não alterou o comportamento térmico do material. O CEO atua como um plastificante eficiente, facilitando a mobilidade da cadeia na mistura, refletida nas propriedades elásticas e térmicas. A eficácia dos filmes compósitos foi verificada contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* inoculados em ovos mexidos, e os resultados indicaram que o filme PLA/PEG/PCL/ZnO/CEO exibiu a maior atividade antibacteriana durante 21 dias de armazenamento a 4 °C, apresentando-se como um material antimicrobiano eficiente.

Wang Y. et al., (2019) forneceram outra aplicação para filmes poliméricos antimicrobianos ao desenvolverem um novo compósito de celulose bacteriana natural (BC), polietilenoglicol (PEG) e polihexametileno biguanida (PHMB), por meio de novas abordagens sintéticas. Segundo os autores, nos últimos anos, curativos ou adesivos à base de celulose bacteriana para reparo de pele ou tecidos moles ganharam ênfase, porém, a maioria destes produtos apresentaram limitações devido à sua baixa flexibilidade, baixa permeabilidade aos gases e nenhuma atividade antibacteriana inerente, o que justifica o estudo dos autores, propondo um novo compósito tendo como base este polímero. A membrana de BC/PEG/PHMB exibiu desempenho favorável, com boa transparência, capacidade de retenção de água e flexibilidade. Os resultados de experimentos bioquímicos *in vitro* indicaram que o compósito apresentou excelente biocompatibilidade e efeito antibacteriano forte. O ensaio *in vivo*, realizado com um modelo de rato, demonstrou que o compósito poderia promover eficientemente a cicatrização e regeneração de feridas na pele. Segundo os autores, este material fornecerá novas ideias para o desenvolvimento futuro de curativos.

Em outra aplicação para polímeros antimicrobianos, Park; Kim (2017) desenvolveram nanofibras de acetato de polivinila (PVA) antimicrobianas por meio da impregnação de cloreto de benzil trietilamônio (BTEAC), sintetizadas por eletrofiação. Em virtude da incorporação de BTEAC, as nanofibras BTEAC-PVA tornaram-se mais hidrofílicas que as nanofibras de PVA puro. Dentre outras avaliações, os autores determinaram a eficiência do material para testes de filtração antimicrobiana, com as nanofibras BTEAC-PVA depositadas no filtro de fibra de vidro. O teste foi realizado contra bactérias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) e bacteriófagos (MS2, PhiX174), demonstrando que as nanofibras BTEAC-PVA poderiam melhorar a remoção de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* consideravelmente, mas não a remoção de MS2 e PhiX174 sob condições de fluxo dinâmico. A área de membranas de filtração antimicrobiana é um campo emergente de pesquisa com materiais poliméricos que apresentem esta característica.

## 2.4 ACETATO DE CELULOSE

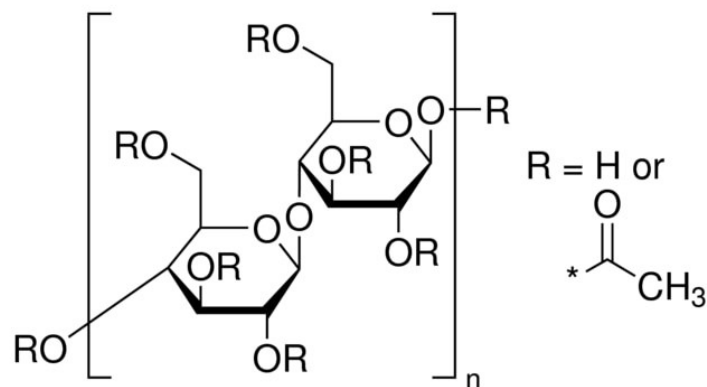
A celulose, um dos materiais naturais mais abundantes no mundo, é considerada um dos melhores substitutos para materiais de suporte não degradáveis, graças à sua boa biocompatibilidade e biodegradabilidade. Materiais naturais que contêm celulose incluem

plantas, algas e bactérias (PANG et al., 2019; PENG et al., 2019). Os materiais de celulose são amplamente utilizados nas indústrias manufatureiras de produtos têxteis, farmacêuticos, aplicações biomédicas, entre outros (GOPI et al., 2019).

O acetato de celulose, cuja estrutura está exposta na

Figura 1, é um dos materiais derivados da celulose, obtido por meio da reação de esterificação desta, na qual ocorre a substituição dos grupos hidroxila das unidades de glicose por grupos acetila. Como consequência pode-se obter materiais com diferentes graus de substituição (GS), sendo este parâmetro o número médio de grupos acetila que substituem as hidroxilas por unidade glicosídica (CERQUEIRA et al., 2010).

Figura 1. Estrutura do acetato de celulose.



Fonte: SIGMA ALDRICH, 2022.

O grau de substituição pode variar de zero, para a celulose, até 3 para um material trissubstituído e esse parâmetro é de extrema importância pois afeta as propriedades do polímero. Através da esterificação, algumas propriedades da celulose podem ser melhoradas e novas funções introduzidas, sendo um dos materiais mais utilizados para fabricação de membranas e filmes poliméricos (JATOI; KIM; NI, 2019; PANG et al., 2019).

#### 2.4.1 Membranas/filmes poliméricos de acetato de celulose

As membranas/filmes poliméricos de acetato de celulose vêm ganhando destaque na comunidade científica em virtude de o acetato de celulose ser um material com inúmeras vantagens, as quais já foram citadas anteriormente. Grande parte dos estudos mais recentes

utiliza o método de *casting* para obtenção de membranas e filmes poliméricos (BASTANTE et al., 2021; CARVALHO et al., 2017; DANNENBERG et al., 2017; INDUMATHI; SAROJINI; RAJARAJESWAR, 2019; MOREIRA GONÇALVES et al., 2020; XIE; HUNG, 2019), pois este é um método fácil e eficiente para produção destes materiais.

Para este procedimento, os pellets de acetato de celulose são solubilizados em um solvente, sendo comumente utilizado para este processo a acetona, principalmente devido a elevada solubilidade do acetato de celulose neste solvente, aliado as suas características interessantes como baixo custo, baixa toxicidade e elevada volatilidade, o que facilita a etapa de evaporação posterior. Nesta etapa, juntamente com o acetato de celulose, o agente antimicrobiano também é solubilizado para que seja adicionado à matriz polimérica, sendo este o momento ideal para a incorporação de agentes ativos no material. Posteriormente, essa solução filmogênica é espalhada sobre uma superfície lisa, formando uma fina camada de líquido, que favorece a volatilização da acetona e a formação do filme. Esta solução é levada em uma estufa para evaporação completa do solvente, restando na placa o filme formado (CARVALHO et al., 2017).

Dentre as aplicações, é possível citar a obtenção de filmes antimicrobianos e/ou antioxidantes para fabricação de embalagens ativas para alimentos, melhorando a estabilidade e garantindo a segurança alimentar (DAIRI et al., 2019). Neste cenário, o acetato de celulose figura como uma excelente matriz para incorporação de agentes ativos antimicrobianos, sendo que diversos trabalhos têm se debruçado no estudo deste material para esta finalidade (BAHMID et al., 2021; DANNENBERG et al., 2017; XIE; HUNG, 2018; PEREIRA et al., 2022).

Ainda, o acetato de celulose também é um material interessante para a fabricação de nanocápsulas que envolvam componentes facilmente degradados por agentes externos, como vitaminas e agentes antimicrobianos, promovendo maior estabilidade para estes compostos, liberando-os de forma gradativa (LIAKOS et al., 2016; LIAKOS et al., 2018; BAEK et al., 2021).

Outra aplicação para as membranas de acetato de celulose é na dessalinização de água por meio de processos osmóticos, pois, segundo Li et al. (2019), se comparado com as membranas convencionais de osmose reversa (geralmente membrana de poliamida), as membranas de acetato de celulose para esta finalidade apresentam as vantagens de proporcionar um bom desempenho de separação, alta rejeição de sal e resistência exclusiva ao cloreto,

fazendo estas membranas ocuparem uma posição importante nesta área. Tal fato foi evidenciado em estudo realizado por Ohland; Salim; Borges (2019), no qual partículas de hidroxiapatita (HA) foram funcionalizadas por tratamento com plasma e incorporadas em membranas de acetato de celulose sintetizadas pelo método de inversão de fase. Caracterizou-se a morfologia e as propriedades físico-químicas da HA funcionalizada e das membranas poliméricas sintetizadas. A funcionalização plasmática foi capaz de aumentar a hidrofiliabilidade da HA pela inserção de grupos hidroxila nas superfícies das partículas. A permeabilidade à água das membranas aumentou com a adição de 1,0% em massa de HA funcionalizada no sistema de dessalinização por osmose reversa, mantendo alta rejeição de cloreto de sódio e sulfato de magnésio. Nos testes de osmose direta, as mesmas membranas proporcionaram um aumento de 66% no fluxo de água, mantendo o fluxo reverso de sal praticamente constante. Esta pesquisa revelou membranas de alto desempenho com potencial aplicação em processos osmóticos.

Entretanto, segundo Li et al. (2019), as membranas de acetato de celulose são pouco resistentes ao ataque bacteriano, o que limita um pouco a sua eficiência e vida útil; tal fato pode ser resolvido evitando a adesão de bactérias na membrana ou então inibindo a propagação das mesmas; o primeiro fator pode ser resolvido reduzindo a hidrofiliabilidade das membranas e/ou diminuindo a sua rugosidade enquanto o segundo empecilho pode ser superado por meio da inserção do agente antimicrobiano na matriz polimérica.

Pandele et al. (2017) deram outra aplicação para membranas de acetato de celulose ao incorporarem nas mesmas partículas de hidroxiapatita (HA). Os autores sintetizaram as referidas membranas a partir de uma solução de polímero em N, N'-dimetilformamida (12% em massa), onde diferentes concentrações de hidroxiapatita (1, 2, 4% em massa, com base na quantidade de polímero) foram dispersas usando sonicação. A síntese de membranas foi realizada por precipitação empregando inversão de fase com água deionizada. A análise de microscopia confirmou a presença de partículas micro/nanoestruturadas de hidroxiapatita na membrana, bem como alterações significativas na morfologia da superfície da mesma. A presença de compostos inorgânicos também influenciou as propriedades térmicas e hidrodinâmicas das membranas compósitas, levando a um comportamento hidrodinâmico mais estável, com variação no fluxo de água no tempo muito menor em comparação à membrana sem a incorporação de HA. Os autores sinalizaram que esse novo material tem potencial aplicação como membrana de filtração para água e também para obtenção de dispositivos biomédicos.

Quando se considera o uso de polímeros para aplicações biomédicas, o acetato de celulose ocupa uma posição de destaque; por exemplo, as mantas de fibra de acetato de celulose obtidas por eletrofição podem ser usadas para imobilização de substâncias bioativas, como vitaminas e enzimas, enquanto o acetato de celulose não poroso pode ser usado para revestimento de *stents* ou proteção da pele após queimaduras ou feridas, além de ser um material comprovadamente eficaz para a engenharia de tecidos na fabricação dos *scaffolds*, fornecendo suporte mecânico e imitando a matriz extracelular para fixação das células, crescimento e formação adicional de tecidos-alvo (HUANG; DEAN, 2020).

Desta forma, é notável que membranas de acetato de celulose possam ser aplicadas tanto para reintegração de tecidos moles quanto duros. Chainoglou et al., (2016) descobriu que o acetato de celulose pode ser usado na engenharia de tecidos de válvulas cardíacas, através de uma promoção bem-sucedida do crescimento e proliferação de células cardíacas, enquanto Nosar et al., (2016) construíram *scaffolds* de acetato de celulose para reconstituição da pele, obtendo bons resultados com este material. Já na engenharia de tecidos duros, alguns estudos têm se detido à utilização de acetato de celulose para reconstituição de tecidos ósseos (GOUMA et al., 2012; TSIAPLA et al., 2018). Foi comprovado que o acetato de celulose é um material apropriado para a preparação de membranas para osseointegração devido à sua excelente biocompatibilidade. A partir dos processos envolvidos na sua degradação são liberados grupos acetil que modificam levemente os fragmentos de glicose e o pH local e não induzem nenhum caráter citotóxico no local da implantação, ou seja, não apresenta efeito adverso no organismo (PANDELE et al., 2017; OPREA et al., 2020).

A forma altamente cristalina da celulose é conhecida por sua resistência à degradação biológica ativa dos mamíferos, uma vez que não possuem enzimas apropriadas para a digestão da celulose. Entretanto, o acetato de celulose pode ser degradado, mesmo que lentamente, em organismos vivos devido ao alto grau de substituição na estrutura da celulose (MODULEVSKY; CUERRIER; PELLING, 2016; RUGGIERO et al., 2015). Em estudo realizado por Ruggiero et al. (2015), os autores submetem membranas de acetato de celulose ao processo de degradação em meio fisiológico simulado, sendo que as medições foram feitas acelerando a degradação por meio do aquecimento da amostra até 65 °C e medindo a concentração total de acetato dissolvido na solução. Segundo os autores, as membranas foram degradadas em um período estimado de 99 dias o que, segundo relatado, é um tempo mais que

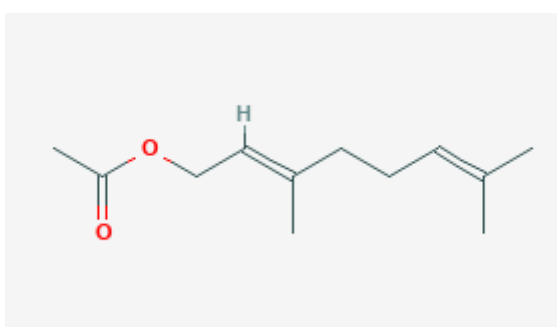
suficiente para a reconstituição dos tecidos (por exemplo, a reconstituição óssea é estimada em 21 dias).

Outros trabalhos realizados também tem sugerido a aplicação de membranas de acetato de celulose funcionalizadas para remoção de metais, como por exemplo, cromo (VI), cádmio (II), chumbo (II), mercúrio (II) em soluções aquosas (LI; LIU; YANG, 2014; YAKOUT et al., 2016; GEBRU; DAS, 2018) e também para a separação de óleo/água, utilizadas no tratamento de efluentes aquosos da indústria petroquímica (CHEN et al., 2009; MANSOURIZADEH et al., 2014) pois, segundo Peng et al. (2019) a separação por membrana é um método comum para tratar águas residuais oleosas na indústria do petróleo, devido às vantagens da baixa poluição, baixo custo pós-tratamento e baixo consumo de energia, e as membranas de acetato de celulose tem ganhando destaque nesta aplicação, despertando uma gama de possibilidades para estudo de melhoramento das suas propriedades.

## 2.5 ACETATO DE GERANILA

Os ésteres são compostos orgânicos comumente encontrados na natureza, sendo responsáveis pelo aroma de muitas flores e frutas. Na indústria são aplicados em medicamentos, aditivos de fragrância para indústrias de sabores e perfumes (CHEUNG; PLOEGER; HU, 2017). Os ésteres derivados do geraniol possuem sabor e aroma agradáveis, dentre os quais se destaca o acetato de geranila, cuja estrutura química está ilustrada na Figura 2.

Figura 2. Estrutura química do acetato de geranila.



Fonte: PUBCHEM, 2021.

É um éster que possui fórmula molecular C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>, com massa molecular de 196,29 g·mol<sup>-1</sup>, densidade relativa de 0,9174 (à 15 °C) e ponto de ebulição de 238,3 °C. Seu

nome IUPAC é [(2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienyl] acetato, sendo que possui como isômero o acetato de nerila. É um monoterpenóide que se apresenta como um líquido incolor, transparente, com leve odor de lavanda e gosto doce e frutado, com notas semelhantes às de banana, pera, maçã e pêssego, amplamente utilizado como aditivo alimentar (sendo, inclusive, regulamentado para tal) para promoção de aromas e também na indústria de perfumes, com o mesmo intuito (PUBCHEM, 2021).

Zeferino (2022) sinalizou que os estudos de toxicidade disponíveis na literatura para o acetato de geranila são referentes ao componente com grau de pureza inferior a 80%, e que ainda, os estudos encontrados são antigos e pouco detalhistas. Este fato impulsionou a autora a avaliar esta característica para o acetato de geranila sintetizado via catálise heterogênea com resina de troca iônica no seu trabalho, o qual apresentou grau de pureza de aproximadamente 96%. O estudo da toxicidade oral do acetato de geranila indicou que o éster se enquadra na Categoria 5 do Sistema de Classificação Global Harmonizado (GHS), apresentando LD50 entre 2000 mg·kg<sup>-1</sup> e 5000 mg·kg<sup>-1</sup>, sendo que, quando ingerido em doses repetidas de até 1 mg·kg<sup>-1</sup>, não apresenta toxicidade.

Muitos estudos realizam a obtenção de óleo essenciais e/ou extratos naturais de plantas em virtude das atividades biológicas importantes vinculadas a estas substâncias, como atividade antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, sendo que o acetato de geranila pode ser encontrado em muitos destes compostos naturais (DJIHANE et al., 2017; DAS et al., 2019; YI et al., 2019).

Em trabalho realizado por Djihane et al. (2017), os autores utilizaram as partes aéreas de *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don argelino, uma espécie de planta com flor pertencente à família *Asteraceae* que ocorre naturalmente nas áreas do Mediterrâneo, para obtenção de óleo essencial por meio da técnica de hidrodestilação. Os autores verificaram que o óleo essencial obtido apresentava 67 compostos responsáveis por 99,24% do óleo, os quais foram identificados com alto teor de sesquiterpenos oxigenados (61,42%), estando o acetato de geranila entre os três mais abundantes, contemplando 10,05% da composição, ficando atrás apenas do  $\alpha$ -Cedrene (13,61%) e  $\alpha$ -Curcumeno (11,41%). Quando avaliada a atividade antimicrobiana deste óleo, os autores obtiveram resultados muito positivos contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e também fungos, sendo que, segundo os autores, essa propriedade pode ser atribuída à composição química do óleo essencial.



Em outro estudo, Gonçalves et al. (2012) extraíram óleo essencial, por meio de hidrodestilação, das partes aéreas de *Thapsia minor*, da família *Apiaceae*, uma planta comum na região mediterrânea, utilizada como especiaria. Os autores identificaram que os principais constituintes do óleo foram os monoterpenos oxigenados, sendo o acetato de geranila o composto majoritário, presente com fração aproximada de 83%, sendo, portanto, esta planta uma excelente fonte deste composto. A atividade antimicrobiana foi testada contra diversas espécies de fungos, apresentando bons resultados, com destaque frente às cepas de dermatófitos, *Cryptococcus neoformans* e *Candida guilliermondii*. Ainda, o óleo também demonstrou ter potente atividade anti-inflamatória *in vitro*. Segundo os autores, a atividade biológica do óleo essencial de *Thapsia minor* pode estar associada à contribuição significativa do acetato de geranila, tendo em vista que foram realizadas análises com este composto isolado, e os resultados foram muito semelhantes se comparados ao óleo essencial.

Das et al. (2019) extraíram o óleo essencial de sementes *Apium graveolens* (aipo), erva anual ou bienal de tamanho pequeno, pertencente à família *Apiaceae* e amplamente cultivada em jardins na Europa, Ásia, África e algumas partes da América do Sul e do Norte, por hidrodestilação. Os autores identificaram 23 substâncias componentes deste óleo, sendo majoritários o acetato de linalil, com percentual de 37,5%, seguido pelo acetato de geranila, que compreende 24,7% do referido óleo. O óleo essencial das sementes de *Apium graveolens* apresentou boa atividade antifúngica frente à *Aspergillus flavus* já na sua forma pura, porém, com o intuito de potencializar esta atividade, os autores prepararam diversas formulações contendo o óleo essencial acrescido de acetato de linalin e acetato de geranila, os constituintes majoritários presentes no referido óleo, os quais os autores assumiram ser os responsáveis pela atividade antimicrobiana de destaque. Quando o referido óleo essencial foi misturado com acetato de linalin e acetato de geranila na proporção 1:1:1, a formulação apresentou o maior percentual de inibição da cepa *Aspergillus flavus*, e os autores destacaram que a mesma teria importância comercial no setor agrícola e alimentar, como um novo conservante verde para proteção de produtos alimentares pós-colheita contra infestações por fungos.

Todos os estudos supracitados reforçam a ideia de que o acetato de geranila, um dos componentes majoritários presentes nos referidos óleos estudados, apresente atividade antimicrobiana potencializada quando em sua forma pura. Essa investigação foi realizada por İşcan (2017), que estudou a ação antimicrobiana do acetato de geranila com grau de pureza superior a 97% contra diferentes microrganismos e observou atividade antimicrobiana contra a

levedura *Candida albicans*, bem como contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e gram-negativas (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Como parte do seu trabalho, Zeferino (2022) também avaliou a atividade antimicrobiana do acetato de geranila sintetizado, sendo que a autora verificou ação antimicrobiana do referido éster para bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*) e também para fungos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Candida albicans*).

É possível isolar o acetato de geranila realizando-se o fracionamento sob vácuo dos óleos essenciais que o tem como componente, entretanto, a disponibilidade limitada das fontes naturais dos óleos torna esse método inadequado para a produção industrial em larga escala. Ainda, a composição dos óleos essenciais naturais depende muito da sua matéria-prima, e como plantas apresentam variabilidade enorme, vinculada principalmente ao clima, condições de solo e sazonalidade, a padronização do produto fica mais complexa, o que reforça a necessidade da síntese deste éster a partir de seu álcool precursor. Desta forma, outros métodos são necessários para a produção destes ésteres, tais como síntese química, extração enzimática ou biocatálise (XIONG et al., 2014; MURCIA et al., 2018).

## 2.6 ESTADO DA ARTE

Neste tópico serão apresentados alguns dos trabalhos que vêm sendo publicados na área de filmes/membranas poliméricas de acetato de celulose com atividade antimicrobiana vinculadas a aplicação em embalagens de alimentos e na área biomédica, que são o foco da utilização futura do material obtido na presente tese.

Quando considerados agentes antimicrobianos naturais, é possível citar o estudo de Pola et al. (2016), no qual os autores produziram filmes ativos à base de acetato de celulose incorporados com diferentes concentrações de óleo essencial de orégano e (OEO) e argila montmorilonita organofílica (MMT30B), com o objetivo de produzirem filmes com boas propriedades térmicas e mecânicas para controlar o crescimento de fungos. As cepas utilizadas para os ensaios microbiológicos foram *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum* e *Rhizopus stolonifer*, sendo que todos os filmes incorporados com OEO apresentaram boa atividade antifúngica, proporcionando um halo de inibição de crescimento, que aumentou de diâmetro

conforme a concentração de OEO aumentava nos filmes. Ainda segundo os autores, a MMT30B aumentou significativamente a rigidez enquanto reduzia as taxas de transferência de oxigênio; já o OEO atuou como plastificante, facilitando a dispersão da MMT30B, aumentando a extensibilidade e diminuindo as taxas de transmissão de vapor de água. Tanto o OEO como o MMT30B melhoraram ligeiramente a resistência térmica dos filmes. Os filmes de acetato de celulose incorporados com OEO e MMT30B apresentaram, portanto, características muito interessantes para o desenvolvimento de embalagens antifúngicas.

Dannenberget al. (2017) produziram filmes ativos de acetato de celulose por meio da incorporação de óleo essencial de pimenta rosa utilizando a técnica de *casting*. A atividade antimicrobiana dos filmes foi testada *in vitro* (difusão em meio sólido, dispersão em meio líquido e volatilização) e *in situ* (utilizando como alimento de referência queijo mozzarella fatiado) frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*. As concentrações de 2, 4 e 6% de OE adicionado aos filmes os tornaram ativos contra *L. monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em todos os meios avaliados, enquanto *Escherichia coli* foi sensível em meio líquido, no teste de volatilização e *in situ*. Já *S. Typhimurium* mostrou sensibilidade aos filmes em meio líquido e *in situ*. Estes resultados indicam que a adição de óleo essencial de pimenta rosa nos filmes de acetato de celulose é interessante para redução da microbiota em alimentos, indicando características favoráveis para seu uso como embalagem ativa.

Diferente dos compostos naturais, Indumathi; Sarojini; Rajarajeswari (2019) utilizaram partículas metálicas para agregar atividade antimicrobiana ao material desenvolvido. Neste estudo, os autores prepararam e caracterizaram filmes de quitosana (CS) e acetato de celulose (AC) incorporados com nanopartículas de óxido de zinco (nano-ZnO), por meio da técnica de *casting*, com objetivo de proporcionar atividade antimicrobiana a esse material. A estabilidade térmica e as propriedades de barreira dos filmes obtidos aumentaram com o aumento da quantidade de nano-ZnO na faixa de 2 a 7,5% (em massa). No que diz respeito às propriedades mecânicas, os filmes de CS-AC incorporados com 5% de nano-ZnO apresentaram a melhor resistência à tração e rigidez, propícios para embalagens de alimentos. Quando avaliada a biodegradabilidade dos filmes, os autores perceberam que, em 28 dias, os filmes foram degradados em aproximadamente 30 a 50%. O filme CS-AC incorporado com 5% nano-ZnO, por apresentar as melhores propriedades mecânicas, foi avaliado quanto às suas propriedades antimicrobianas frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*,

apresentando zonas de inibição muito próximas para ambas as bactérias. Os autores avaliaram a capacidade deste filme em reduzir a proliferação microbiana em uvas, evitando a sua degradação e estendendo sua vida útil. Como resultado, percebeu-se que o filme prolongou a vida útil dos frutos em até 9 dias, sendo que estes resultados atestam a utilização dos filmes de CS-AC-ZnO para reduzir a carga microbiana e aumentar a vida útil de frutas.

Abou-Yousef et al. (2018) apresentaram um material antimicrobiano eficiente e seguro para uso em diferentes finalidades, com base em nanopartículas de cobre (NPs-Cu) incorporadas na matriz de acetato de celulose (AC) por meio da técnica de *casting*, nas proporções molares de 2% e 6%. A presença das NPs-Cu incorporados aos filmes de AC afetaram levemente a resistência a tração dos filmes. Foi realizado um estudo sobre a atividade antibacteriana desse nanocompósito para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans*. Os autores verificaram que os filmes contendo NPs-Cu na proporção de 2% exibiram a maior atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados, apresentando halos de inibição variando de 15 mm (*Aspergillus niger*) até 21 mm (*Staphylococcus aureus*). Os autores ainda sinalizaram que as NPs-Cu na proporção de 2% apresentaram boa distribuição na matriz polimérica de acetato de celulose, ao contrário das NPs-Cu na proporção de 6%, as quais apresentaram aglomerados dentro da matriz polimérica. Ainda, as NPs-Cu promoveram um melhoramento na estabilidade térmica dos filmes.

Seguindo esta mesma proposta de obtenção de filmes antimicrobianos de acetato de celulose para aplicação em embalagens ativas para alimentos, Xie; Hung (2019), também utilizaram a técnica de *casting* para obter filmes biodegradáveis por meio da incorporação de nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO<sub>2</sub>) em três diferentes polímeros: acetato de celulose (AC), policaprolactona (PCL) e poli (ácido láctico) (PLA), nas proporções de 1, 3 e 5% (em massa). A atividade antimicrobiana dos filmes foi avaliada sob iluminação com luz UV-A a uma intensidade luminosa de  $1,30 \pm 0,15 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$  por 2 h frente à bactéria *Escherichia coli*. Os filmes de CA incorporados com nano-TiO<sub>2</sub> apresentaram redução na carga bacteriana, sendo que esta redução aumenta com o aumento da concentração de nano-TiO<sub>2</sub>, logo, a formulação contendo com 5% (em massa) de nano-TiO<sub>2</sub> apresentou maior atividade bactericida, apresentando redução de  $1,69 \log \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Já os filmes de PCL e PLA incorporados com as mesmas nanopartículas não apresentaram propriedades biocidas significativas. Ainda, os filmes de AC incorporado com nano-TiO<sub>2</sub> apresentaram elevada transparência e atividade fotocatalítica, propriedades estas que, juntamente com a atividade antimicrobiana pronunciada,

promove o este filme como potencial material para ser usado como embalagem antimicrobiana de alimentos.

Um estudo com resultados interessantes foi realizado por Moreira Gonçalves et al (2020). Neste trabalho, os autores desenvolveram filmes de acetato de celulose (CA) adicionados com óleo essencial de erva-doce (FEO) na proporção de 50% (m/v) e glicerol, com percentual de 5, 10, 20 e 30% (m/v). Os resultados mostram que a incorporação de diferentes concentrações do plastificante causou aumento na espessura, taxa de transmissão de vapor de água e resistência à tração dos filmes, além de alterar as propriedades ópticas e demonstrar possível interação química com a matriz do acetato de celulose. As imagens de microscopia eletrônica de varredura revelaram que a adição de glicerol causou alterações morfológicas na superfície e na região interna de todos os filmes. Quando avaliada a atividade antimicrobiana do óleo essencial, os autores verificaram que este foi eficaz contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. No entanto, nenhum dos filmes avaliados apresentaram atividade antimicrobiana, ou seja, não inibiram o crescimento desses microrganismos. Este fato é curioso e, segundo os autores, é devido a possibilidade do FEO apresentar alguma incompatibilidade com a matriz polimérica, ficando preso entre as cadeias sem conseguir manifestar sua atividade antimicrobiana. Assim, diante dos resultados expostos, os autores concluíram que os filmes desenvolvidos podem ser utilizados para embalar alimentos desde que a finalidade não seja a conservação, visto que os filmes não manifestaram a característica antimicrobiana. Logo, fica evidente a necessidade do estudo da atividade antimicrobiana dos materiais pós incorporação do agente antimicrobiano, pois somente a adição nas matrizes poliméricas não é garantia de que a propriedade seja manifestada nos materiais.

Em estudo recente, Pereira et al (2022) extraíram e acetilaram a celulose do pseudocaule da banana (*Musa acuminata*) para preparar membranas com potencial uso em embalagens de alimentos. A membrana de acetato de celulose (AC) foi produzida pelo método de imersão de fases, sendo incorporada com extratos de semente de Butiá (AC-SB) ou polpa de Butiá (AC-PB) obtidos da fruta *Butia catarinenses*. As membranas AC, AC-SB e AC-PB produzidas foram avaliadas quanto às suas propriedades físico-químicas, mecânicas, térmicas e antibacterianas. Os autores verificaram que os extratos influenciaram nas propriedades mecânicas das membranas, reduzindo o módulo de elasticidade e a deformação na ruptura se comparadas as membranas de AC sem a adição dos extratos. A análise termogravimétrica confirmou a estabilidade térmica das membranas, enquanto a análise antimicrobiana atestou

que as membranas CA-BS e CA-BP podem inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em sua superfície, confirmando o potencial uso dessas membranas como embalagem biodegradável para conservação de alimentos.

Considerando aplicações na área biomédica, é possível citar o estudo Felgueiras et al. (2020), no qual os autores desenvolveram uma nova alternativa para curativos convencionais ao proporem o processamento de dois polímeros biodegradáveis, acetato de polivinila (PVA) e acetato de celulose (AC), na proporção 80/20 os quais foram obtidos na forma de filmes através de um novo método que combina princípios de *casting* e inversão de fases. Os autores perceberam que a incorporação do AC na matriz polimérica provocou a diminuição da resistência mecânica e do alongamento na ruptura dos filmes, porém, isso não comprometeu a característica dos filmes, que mesmo com esta alteração, foram classificados como flexíveis e resistentes mecanicamente, aptos para o propósito pretendido. Para dar sequência ao trabalho, os autores incorporaram o antibiótico vancomicina no filme, de modo a proporcionar ação antimicrobiana ao mesmo. A imobilização da vancomicina mostrou-se eficiente na promoção da ação antibacteriana do filme contra a bactéria *Staphylococcus epidermidis*, o que demonstra a potencialidade dos filmes de PVA/AC para possíveis aplicações de cicatrização de feridas.

Ainda, quando se considera a aplicação biomédica dos filmes de acetato de celulose desenvolvidos, diversos estudos têm focado na realização tanto de testes *in vitro* como de testes *in vivo* para atestar a biocompatibilidade dos filmes antimicrobianos em desenvolvimento. Por exemplo, Gomaa et al. (2017) prepararam curativos antimicrobianos à base de poli (ácido láctico) (PLA) e acetato de celulose (AC) para o tratamento de feridas, por meio da incorporação de timoquinona (TQ) aos *scaffolds*, com intuito de acelerar a taxa de cicatrização da ferida e reconstrução da pele. Os curativos obtidos de PLA/AC carregados de TQ ofereceram muitas vantagens, como imitar a matriz extracelular por meio da estrutura nanofibrosa 3D, promovendo a proliferação celular devido à hidrofiliabilidade e bioatividade do acetato de celulose. Os curativos também se mostraram antimicrobianos frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, além de que preveniram a infecção bacteriana nos estágios iniciais devido à presença de TQ e mantiveram a carga bacteriana mínima possível na área da ferida por meio da liberação sustentada do medicamento por 9 dias. A avaliação *in vivo*, realizada por meio do tratamento de feridas dorsais de ratos, demonstrou que os *scaffolds* de formulação PLA:AC (7:3) incorporados com TQ promoveram um aumento significativo do processo de cicatrização da ferida, aumentando a reconstituição do tecido epitelial. Ainda, os

autores sinalizaram que o aumento da liberação do fármaco com maior concentração na matriz polimérica após cerca de 5-6 dias pode ser atribuída à degradação hidrolítica do PLA, que é degradado de forma mais fácil e rápida que o acetato de celulose. Durante esse processo, ocorre a redução da massa molar do polímero, o que promove a difusão do fármaco nas regiões porosas criadas na matriz, acarretando um aumento acentuado na taxa de liberação do medicamento. Portanto, os resultados demonstram que a membrana desenvolvida pelos autores tem potencial aplicação para a área biomédica, como um novo material para desenvolvimento de curativos antimicrobianos.

Em outro estudo vinculado ao estudo da biocompatibilidade do acetato de celulose, dos Santos et al (2021) prepararam *scaffolds* de nanofibras de acetato de celulose incorporados com extrato de urucum por meio da técnica de eletrofiação, avaliando a citotoxicidade *in vitro* e também o potencial de cicatrização de feridas *in vivo*, utilizando ratos como animal modelo. A avaliação físico-química e térmica do material resultante mostrou que a incorporação de urucum não afetou significativamente a estabilidade térmica ou química do polímero. Ainda, o extrato de urucum não demonstrou citotoxicidade. Os experimentos *in vivo* foram realizados por meio da criação de uma lesão cutânea em ratos e posterior inserção do material, sendo que nenhuma cicatriz foi evidente no local de implantação 15 dias após a intervenção, mas a análise macroscópica da camada subcutânea revelou a presença de material, sem sinais de inflamação, o que sugeriu que a biocompatibilidade do acetato de celulose foi mantida mesmo com a incorporação de urucum. Após 60 dias, o implante polimérico de acetato de celulose incorporado com urucum ainda estava presente nos animais. Com estes resultados, os autores confirmaram o potencial deste material para aplicações na cicatrização de feridas.

Sofi et al. (2021) prepararam nanofibras multifuncionais de acetato de celulose contendo hidroxiapatita (HAp) como agentes nucleante e nanopartículas (NPs) de prata (Ag) para formar um biomaterial com ação antibacteriana. As nanofibras foram devidamente caracterizadas, revelando a existência de HAp e Ag NPs no material. A atividade antimicrobiana foi avaliada frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sugerindo o potencial das nanofibras em conter o crescimento bacteriano. Quando a perda de massa foi avaliada em PBS, os autores relatam que a presença de HAp e Ag NPs proporcionou um aumento nas taxas de degradação, pois esses compostos diminuem a densidade da fibra e, como resultado, torna-se facilmente suscetível à degradação, apresentando cerca de 18,6% da perda de massa após 60 dias de testes, em comparação com os apenas 6,1% no material com acetato

de celulose puro. Os resultados certificam que essas nanofibras possuem enorme potencial para engenharia de tecidos moles e duros.

Conforme os estudos elencados, fica evidente que a atividade antimicrobiana para os filmes de acetato de celulose está ainda muito atrelada a partículas e nanopartículas metálicas e compostos naturais, demonstrando a oportunidade vinculada ao desenvolvimento de filmes antimicrobianos de acetato de celulose incorporados com o acetato de geranila.



### CAPÍTULO 3

Neste capítulo está apresentado o artigo publicado com os resultados e discussões da primeira etapa desta tese. O estudo foi publicado na *Research, Society and Development* (Vol 11 (1), 2022) intitulado como: “*Antimicrobial cellulose acetate films by incorporation of geranyl acetate for active food packaging application*”.

#### **Abstract**

The development of new antimicrobial polymeric materials is in prominence due to its versatility of applications, especially for the manufacture of active packaging food. Cellulose acetate is an example of polymeric material used to this purpose, due to its characteristics of biodegradability and easy processing, in addition its natural origin and no toxicity. Geranyl acetate is an ester derived from geraniol, which has good antimicrobial properties and good thermal stability, which makes it interesting to be applied as an antimicrobial agent, avoiding the trivial and often problematic metallic nanoparticles and also volatile essential oils. In this work, antibacterial and antifungal cellulose acetate films were obtained through the incorporation of geranyl acetate ester (in concentrations of 0.5 and 1.0% v/v), by using the casting technique. This new material was tested against gram-positive and gram-negative bacteria and fungi. Results showed that it is possible to obtain antibacterial and antifungal cellulose acetate films with the incorporation of geranyl acetate ester, with excellent antibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacteria and good antifungal activity.

**Keywords:** Cellulose acetate; Geranyl acetate; Biodegradable polymer; Antimicrobial material; Active Packaging.

#### 3.1 INTRODUCTION

The fossil raw materials replacement by renewable alternatives is a trend that contributes to the generation of more suitable materials for the recycling and also that are biodegradable (Zhu, Romain & Williams, 2016). An example are biodegradable polymers/biopolymers, which consist of materials that can be consumed spontaneously, through the action of microorganisms such as naturally occurring bacteria, fungi and algae,

along with other processes such as photodegradation, oxidation and hydrolysis, providing a reduction in the accumulation of solid waste in ecosystems (Zhong, Godwin, Jin & Xiao, 2019). Most of these materials use renewable natural biomass as a raw resource for obtaining them, as they have the advantage of reducing the impact on the environment, especially carbon dioxide emissions (Al-Jahwari & Pervez, 2020).

Currently the major food industries concern is food safety and quality, which is deeply associated with growth inhibition or even complete inactivation of the pathogenic microorganisms presents, such as bacteria and fungi harmful to human and animal health, responsible for reducing the shelf life of food and increase the risk of foodborne illness. In this context, antimicrobial active packages are developed, which are designed to control microbial proliferation through the incorporation of an antimicrobial agent in its composition, making it possible to extend the shelf life of food, maintain food safety and minimize wastage (Glicerina et al., 2021, Krepker et al., 2017). Therefore, developing an antimicrobial polymeric material that can be used to obtain active packaging and also does not harm the environment is a challenge at a global level.

One of the polymers used to make antimicrobial biodegradable films is the cellulose acetate ester (CA), as it is a biocompatible biopolymer, it is non-toxic, has high mechanical resistance and is hydrophilic (Dairi et al., 2019, Jatoi, Kim & Ni, 2019, Xie & Hung, 2018). The CA biodegradation has also been investigated in some studies, evaluating, among other things, the polymeric material mass loss under certain conditions of biodegradation and also the biological activity in the degradative process, attesting that this material is, in fact, biodegradable (Ishigaki, Sugano, Ike & Fujita, 2000, Mostafa, Farag, Abo-dief & Tayeb, 2018).

Currently the CA is applied in the manufacture of active food packaging, in which it is the base material for the natural antimicrobial agents incorporation (such as extracts and essential oils) or synthetic (for example, metal oxide nanoparticles), originating films capable of inhibiting the pathogenic microorganisms proliferation, protecting and extending the shelf life of the food being packaged (Gutiérrez-García et al., 2021, Dannenberg et al., 2017, Jatoi et al., 2019, Pola et al., 2016, Xie & Hung, 2018, Xie, Pan & Cai, 2022). However, essential oils have high thermal degradation, starting its degradation in temperatures usually lower than the processing temperatures of polymers, while metallic nanoparticles have toxicity even with low concentrations, such as silver nanoparticles (Tortella et al., 2020).

In this sense, is interesting to use an antimicrobial additive with low volatility, high thermal stability and low toxicity. The compound added to the cellulose acetate polymer was geranyl acetate, an ester derived from geraniol alcohol, widely used by the perfume industry due its organoleptic properties (Xiong, Huang, Zhang & Hou, 2014), being classified as an edible aroma, present in the list of foods for human consumption, recognized as safe by the Food And Drug Administration (FDA). Geranyl acetate has a higher thermal degradation temperature (242 °C) compared to most natural essential oils, which have a fast mass loss as a function of time and temperature. For orange, lemongrass and basil essential oils, for example, the degradation starts at room temperature, and the evaporation ends at 118.1, 166.7 and 164.2 °C, respectively (Martins, Sbaite, Benites & Maciel, 2011).

Thus, the main objective of this work was to obtain an antibacterial cellulose acetate films with the incorporation of the geranyl acetate ester, in the shortage view studies that use an ester as an antimicrobial agent in polymeric materials.

## 3.2 METHODOLOGY

### 3.2.1 Films preparation

The geranyl acetate ester was synthesized by chemical route catalyzed by a commercial resin by the research group Development and Chemical and Biotechnological Optimization Processes of the Universidade Comunitária da Região de Chapecó – Unochapecó (Zeferino et al., 2021). Cellulose acetate (39.8% by weight of acetyl, average molar mass of approximately 30.000 g/mol) was purchased from Sigma-Aldrich. These substances were processed in order to obtain polymeric films using the casting technique based on the methodology suggested by Takeuchi, Geraldine, Moura & Silveira (2017) and Gouvêa, Mendonça, Soto & Cruz (2015).

To obtain the films, 0.2 g of cellulose acetate were diluted in 9 mL of acetone with geranyl acetate ester in concentrations of 0.5 and 1.0 % (v/v). The mixture was stirred for 1 hour in a shaker at room temperature and then these solutions were poured into glass plates with a smooth surface. After this process, the plates containing the films were taken to an oven, kept under 50 °C and a vacuum of 400 mmHg for 3 hours, in order to carry out the acetone

evaporation. After the solvent has evaporated, the films were removed from the plates. As a control, films without ester addition were produced (Carvalho, et al., 2017, Gouvêa et al., 2015).

### 3.2.2 Films antimicrobial analysis

#### 3.2.2.1 Evaluation of bacterial growth inhibition on the films surface

Samples of the cellulose acetate films (2 x 2 cm), with and without geranyl acetate, were subjected to the test of counting surviving microorganisms over time (death curve), according to the international standard JIS Z 2801- 10 for the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The inoculum for the analysis consists of a microbial solution containing  $10^4$  CFU/mL, which was sown on the surface of the films, and samples for analysis were collected at 0, 1, 2, 3, 6 and 24 h, evaluating the CFU count up. The number of viable bacteria/cm<sup>2</sup> was determined using Equation 1.

$$N = \frac{C \cdot D \cdot V}{A} \quad (1)$$

Where:

N: number of viable bacteria/cm<sup>2</sup>, C: number of colonies (CFU), D: dilution factor (dimensionless); V: volume (mL) of 0,85% NaCl solution (10 mL) and A: surface area (4 cm<sup>2</sup>).

#### 3.2.2.2 Evaluation of fungi growth inhibition on the films surface

For the evaluation of the growth inhibition of fungi on the surface of the developed films, the standards JIS Z 2801-10 (adapted for fungi) and ASTM G21-15 were used as basis, using *Aspergillus niger* as a reference specie. Cellulose acetate films (2 x 2 cm) with and without geranyl acetate were inoculated with 40 µL of the fungal solution containing  $10^5$  spores/mL and inserted in a petri dish together with 1 mL of previously sterilized water, with the objective of maintaining the humidity of the environment and enabling the growth of the fungus. The plates containing the inoculated samples were incubated in an oven at  $28 \pm 2$  °C for 7 days.

After the incubation period, the film samples were removed from the petri dishes and inserted in a stomacher bag together with 10 mL of sterile saline water (0.85%) for homogenization, in order to extract the microorganisms, present on the surface of the samples. A fraction of 1 mL of the resulting solution was removed and inoculated by depth on Sabouraud agar.

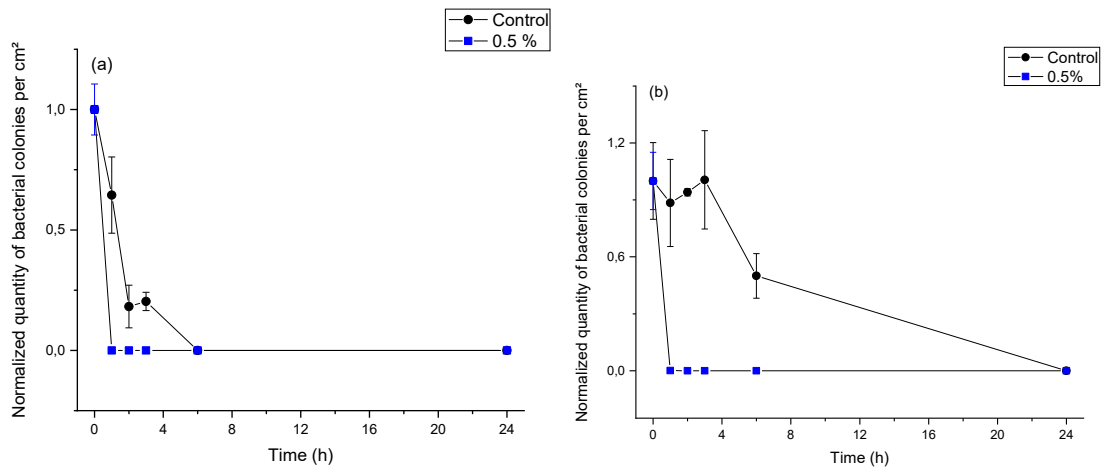
The plates were incubated in an oven at  $28 \pm 2$  °C for 7 days and, after the incubation time had elapsed, the plates were evaluated according to fungal growth, using the classification provided by the standard ASTM G21-15. When none growth is observed, the rating is 0; traces of growth (less than 10 %), the rating is 1; for light growth (10 to 30 %), medium growth (30 to 60%) and heavy growth (60% to complete coverage) the ratings are 2, 3 and 4, respectively.

### 3.3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.3.1 Evaluation of bacterial growth inhibition on the films surface

In order to evaluate the antibacterial potential of cellulose acetate films incorporated with geranyl acetate ester, the death curve test was performed. This methodology is the most designed to evaluate an antimicrobial capacity of polymeric films, considering that it evaluates the growth of bacteria on the surface of these materials over time. Figure 3.1 illustrates the result of this test for *Staphylococcus aureus* (a) and *Escherichia coli* (b), respectively, with inoculum at a concentration of  $10^4$  CFU/mL.

Figure 3.1 Results obtained with the death curve test for the polymeric films containing 0% (control) and 0.5% geranyl acetate for (a) *Staphylococcus aureus* and (b) *Escherichia coli*.



Source: Authors.

As seen in Figure 3.1 cellulose acetate antimicrobial films containing 0.5% geranyl acetate were very efficient, both for the gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (a) and for the gram-negative bacteria *Escherichia coli* (b). The samples had a lower bacterial count compared to the film without antimicrobial agent (control) during the time that the cells were viable. In addition, it appears that in one hour, for both bacteria, the cell count was practically null, and this behavior was also verified in the other sampled times, showing that the cellulose acetate film containing 0.5% geranyl acetate eliminates bacteria on its surface. Therefore, it shows an excellent antibacterial material, effective for gram-positive as well as gram-negative bacteria.

This fact is best observed with the results shown in Table 3.1 (data were subjected to the analysis of variance (ANOVA) to determine the significant difference between the means; means multiple comparisons were performed using Tukey test at a significance level of 0.05). Initially (time 0) there was a high bacterial cell count for both films analyzed. After 1 hour, the count of normalized quantity of bacterial colonies per cm<sup>2</sup> for films containing 0.5% geranyl acetate is null or practically null, that is, this film not only inhibits bacterial growth but also eliminates all bacteria present on its surface - whether they are gram-positive or gram-negative - showing the high antibacterial efficiency of this material.

Table 3.1 Bacterial count for the different times sampled in the death curve test for the polymeric films.

Time (h)	Normalized quantity of bacterial colonies per cm <sup>2</sup>			
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	0% (control)	0.5%	0% (control)	0.5%
0	1.00±0.02 <sup>Aa</sup>	1.00±0.11 <sup>Aa</sup>	1.00±0.20 <sup>Aa</sup>	1.00±0.15 <sup>Aa</sup>
1	0.64±0.16 <sup>Ab</sup>	0.00±0.00 <sup>Bb</sup>	0.88±0.23 <sup>Aa</sup>	9.90x10 <sup>-4</sup> ±1.70x10 <sup>-3Bb</sup>
2	0.18±0.09 <sup>Ac</sup>	0.00±0.00 <sup>Bb</sup>	0.94±0.02 <sup>Aa</sup>	0.00±0.00 <sup>Bb</sup>
3	0.20±0.04 <sup>Ac</sup>	0.00±0.00 <sup>Bb</sup>	1.00±0.26 <sup>Aa</sup>	0.00±0.00 <sup>Bb</sup>
6	0.00±0.00 <sup>Ad</sup>	0.00±0.00 <sup>Ab</sup>	0.50±0.12 <sup>Ab</sup>	0.00±0.00 <sup>Bb</sup>
24	0.00±0.00 <sup>Ad</sup>	0.00±0.00 <sup>Ab</sup>	0.00±0.00 <sup>Ac</sup>	0.00±0.00 <sup>Ab</sup>

Equal lowercase letters represent that there are no significant differences between lines ( $p < 0.05$ ) and equal uppercase letters represent that there are no significant differences between columns ( $p < 0.05$ ). Source: Authors.

Another interesting fact is that, during the analysis time, there is a reduction in the quantity of viable cells of *Staphylococcus aureus* on the polymer surface without the addition of geranyl acetate (control). Within 6 hours, there were no more viable cells. This behavior was already expected because it is natural for bacteria to die after some time, due to the absence of nutrients and of water on the surface, which are essential for the survival of these microorganisms (Tortora, Funke & Case, 2017). It is worth mentioning that, in the time of 1 hour, the reduction of the reference film (control) was only 35.53% while the reduction for the film containing the antimicrobial agent was 100.00% (Table 3.2) that is, the film is highly efficient to prevent microbial growth.

Table 3.2 Percentage of reduction in bacterial count after 1 hour of contact with polymeric films.

Sample	Growth reduction (%)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
0% (control)	35.52	11.58
0.5%	100.00	99.90

Source: Authors.

A similar behavior was observed when *Escherichia coli* was inoculated in the polymer without the addition of ester (control), however, a statistically significant reduction in growth was observed only after 6 hours, with the number of colonies remaining constant until this time, showing the lower susceptibility of gram-negative bacteria to external agents, affirming the greater resistance of this class of bacteria, which, in the time of 1 hour, showed a reduction of only 11.58% (Table 3.2) in the count of their viable cells. This difference between gram-positive and gram-negative bacteria can be explained because the cell structure of gram-positive and gram-negative bacteria is not the same. While the cells of gram-positive bacteria have only one outer layer, gram-negative bacteria have an additional second membrane, with a phospholipid bilayer structure, which provides additional protection for the inner cytoplasmic membrane. Thus, gram-positive bacteria are more susceptible to the penetration of external molecules in their cells, which makes them more fragile, and justifies the lower microbial count on the material surface for the *Staphylococcus aureus* bacteria (Muñoz-Bonilla & Fernández-García, 2012). It is important to show that the reduction for this class of bacteria, in the referred time, was 99.90% (Table 3.2) that is, the film is also efficient for gram-negative bacteria.

Some studies have already been carried out using cellulose acetate as a polymeric base to obtain antimicrobial films through the incorporation of several antimicrobial agents such as thymol (Dairi, Ferfera-Harrar, Ramos & Garrigós, 2019) and rosemary and aloe essential oils (El Fawal, Omer & Tamer, 2019) and these materials, when evaluated by different methodologies, have showed antibacterial activity against gram-positive bacteria and gram-negative bacteria, showing that the cellulose acetate is an excellent matrix for receiving different antimicrobial agents, which was also evidenced in the present study.

In view of the excellent performance of the cellulose acetate film containing 0.5% geranyl acetate, which has inhibited bacterial growth in just 1 hour of contact, the evaluation of the film with 1.0% of geranyl acetate is irrelevant, because the antibacterial activity of the cellulose acetate film containing a lower concentration of geranyl acetate can already be considered excellent.

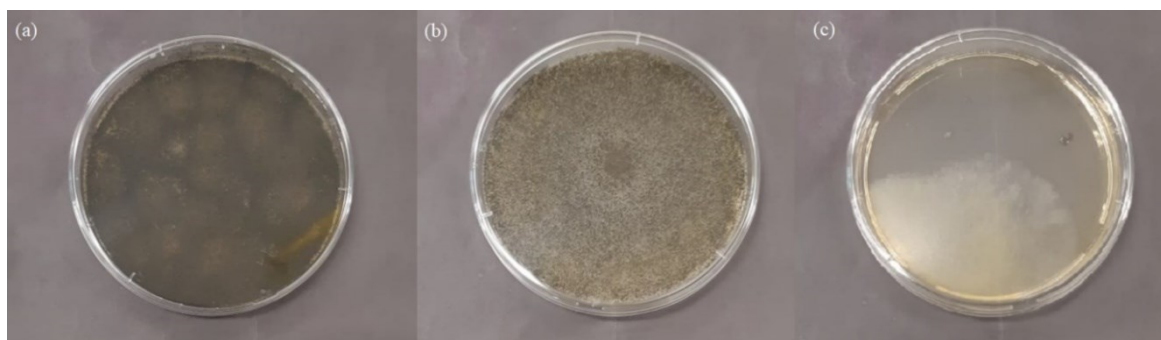
### **3.3.2 Evaluation of fungi growth inhibition on the films surface**

The fungus *Aspergillus niger* was the microorganism used to evaluate the ability of the developed films to inhibit fungal growth on its surface. Figure 3.2 shows the microbiological



results of growth of the fungus on the films surface containing 0% (control), 0.5% and 1.0% of geranyl acetate.

Figure 3.2 Results obtained with the analysis of the growth of the fungus *Aspergillus niger* on the surface of the polymeric films; (a) 0% (control), (b) 0.5% and (c) 1.0% of geranyl acetate.



Source: Authors.

For the film without the addition of the antimicrobial agent, the fungus *Aspergillus niger* grew abundantly, receiving the maximum classification on the growth rating (Table 3.3), completely filling the plate surface. However, when the fungus was inoculated in the film containing 0.5% antimicrobial ester, it is clear that the growth of the microorganism was lower, receiving a rating of 3 on the scale (Table 3.3). This rate was assumed because, according to Figure 3.2 (b), it is possible to observe that the cell density is much lower, showing the capacity to reduce fungal growth on the film surface containing ester in a concentration of 0.5%, this reduction being associated with the presence of the antimicrobial agent.

Table 3.3 Growth rating for the fungus *Aspergillus niger* on the polymeric films.

Sample	Rating
0% (control)	4
0.5%	3
1.0%	1

Source: Authors.

This fact is corroborated with Figure 3.2 (c), showing the fungal growth of the film that contains a higher concentration of ester (1.0%). This condition can be classified as 1 on the growth scale (Table 3.3), because it shows only traces of growth of the fungus *Aspergillus*

*niger*, with surface coverage of less than 10% of the plate. Therefore, an excellent antifungal activity was detected in the cellulose acetate film containing 1.0% geranyl acetate.

In a similar study, Dairi et al. (2019) have obtained a polymeric material based on cellulose acetate (among other materials), with the incorporation of thymol as an antimicrobial agent. These films, in addition to showing antibacterial activity, have also showed good results as antifungal materials, showing greater activity against the growth of *Aspergillus niger* in the concentration of 8.0% of antimicrobial agent.

For the material developed, both antifungal and antibacterial activity were achieved with low concentrations of geranyl acetate ester, which is an important consideration, given that, as a rule, the antimicrobial agent implies an additional cost to the material developed. Therefore, the smaller the amount of the antimicrobial agent, the more interesting and competitive the antimicrobial cellulose acetate films will appear.

### 3.4 CONCLUSION

The casting technique made it possible to obtain a new polymeric cellulose acetate material incorporated with the antimicrobial ester geranyl acetate, which showed antimicrobial activity against fungal e bacterial. This result is very interesting, because it allows the use of this new antimicrobial material for applications in active food packaging. In this context, the present work encourages and directs other studies involving for example, the thermal and mechanical films characterization, studies of the ester release from the polymer matrix and also evaluation of the ester influence on the biodegradation of cellulose acetate films.

### Acknowledgments

The authors acknowledge Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ) for the structure to accomplish this work and also Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) for financial support.

### References

Al-Jahwari, F. S., & Pervez, T. (2020). The Potential of Environmental-Friendly Biopolymers as an Alternative to Conventional Petroleum-Based Polymers. *Encyclopedia of*

*Renewable and Sustainable Materials*, 200–206. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.11295-0>

American Society for Testing and Materials – ASTM G21-15 Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi, 2015.

Carvalho, D. de M., Takeuchi, K. P., Geraldine, R. M., Moura, C. J. de, & Silveira, M. F. A. (2017). Filme ativo de acetato de celulose incorporado com nanosuspensão de curcumina. *Polímeros*, 27(spe), 70–76. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.2232>

Dairi, N., Ferfera-Harrar, H., Ramos, M., & Garrigós, M. C. (2019). Cellulose acetate/AgNPs-organoclay and/or thymol nano-biocomposite films with combined antimicrobial/antioxidant properties for active food packaging use. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 508–523. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.10.042>

Dannenber, G. da S., Funck, G. D., Cruxen, C. E. dos S., Marques, J. de L., Silva, W. P. da, & Fiorentini, Â. M. (2017). Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 81, 314–318. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.04.002>

El Fawal, G.F., Omer, A.M. & Tamer, T.M. (2019). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities for cellulose acetate films incorporated with Rosemary and Aloe Vera essential oils. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 1510–1518. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03642-8>

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Title 21 - Food and drugs. Chapter I - Food and drug administration, department of health and human services. Subchapter B - Food for human consumption (continued). Part 182 - Substances generally recognized as safe.

- Tortora, G. J., Funke, B.R., Case, C.L. Microbiologia. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 935.
- Glicerina, V., Siroli, L., Canali, G., Chinnici, F., Capelli, F., Lanciotti, R., Colombo, V., & Romani, S. (2021). Efficacy of biodegradable, antimicrobial packaging on safety and quality parameters maintenance of a pear juice and rice milk-based smoothie product. *Food Control*, 128, 108170. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2021.108170>
- Gouvêa, D. M., Mendonça, R. C. S., Soto, M. L., & Cruz, R. S. (2015). Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 85–91. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.03.014>
- Gutiérrez-García, G. J., Quintana-Romero, L. A., Morales-Figueroa, G. G., Esparza-Romero, J., Pérez-Morales, R., López-Mata, M. A., Juárez, J., Sánchez-Escalante, J. J., Peralta, E., Quihui-Cota, L., & Soto-Valdez, H. (2021). Effect of *Yucca baccata* butanolic extract on the shelf life of chicken and development of an antimicrobial packaging for beef. *Food Control*, 127, 108142. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2021.108142>
- Ishigaki, T., Sugano, W., Ike, M., & Fujita, M. (2000). Enzymatic degradation of cellulose acetate plastic by Novel degrading bacterium *Bacillus* sp. S2055. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(4), 400–405. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80008-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80008-6)
- Jatoi, A. W., Kim, I. S., & Ni, Q. Q. (2019). Cellulose acetate nanofibers embedded with AgNPs anchored TiO<sub>2</sub> nanoparticles for long term excellent antibacterial applications. *Carbohydrate Polymers*, 207, 640–649. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.12.029>
- JIS Z 2801:2010. Antibacterial products - Test for antibacterial activity and efficacy.
- Krepker, M., Shemesh, R., Danin Poleg, Y., Kashi, Y., Vaxman, A., & Segal, E. (2017). Active food packaging films with synergistic antimicrobial activity. *Food Control*, 76, 117–126. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2017.01.014>

- Martins P., Sbaite P., Benites C., Wolf Maciel M., 2011, Thermal Characterization of Orange, Lemongrass, and Basil Essential Oils. *Chemical Engineering Transactions*, 24, 463-468. <https://doi.org/10.3303/CET1124078>
- Mostafa, N. A., Farag, A. A., Abo-dief, H. M., & Tayeb, A. M. (2018). Production of biodegradable plastic from agricultural wastes. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(4), 546–553. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2015.04.008>
- Muñoz-Bonilla, A., & Fernández-García, M. (2012). Polymeric materials with antimicrobial activity. *Progress in Polymer Science*, 37(2), 281–339. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2011.08.005>
- Pola, C. C., Medeiros, E. A. A., Pereira, O. L., Souza, V. G. L., Otoni, C. G., Camilloto, G. P., & Soares, N. F. F. (2016). Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. *Food Packaging and Shelf Life*. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.07.001>
- Tortella, G. R., Rubilar, O., Durán, N., Diez, M. C., Martínez, M., Parada, J., & Seabra, A. B. (2020). Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment. *Journal of Hazardous Materials*, 390, 121974. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2019.121974>
- Xie, J., & Hung, Y. C. (2018). UV-A activated TiO<sub>2</sub> embedded biodegradable polymer film for antimicrobial food packaging application. *LWT*, 96, 307–314. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.05.050>
- Xie, Y., Pan, Y., & Cai, P. (2022). Cellulose-based antimicrobial films incorporated with ZnO nanopillars on surface as biodegradable and antimicrobial packaging. *Food Chemistry*, 368, 130784. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.130784>

- Xiong, J., Huang, Y., Zhang, H., & Hou, L. (2014). Lipase-Catalyzed Transesterification Synthesis of Geranyl Acetate in Organic Solvents and Its Kinetics. *Food Science and Technology Research*, 20(2), 207–216. <https://doi.org/10.3136/fstr.20.207>
- Zeferino, R. C. F., Piaia, V. A. A., Orso, V. T., Pinheiro, V. M., Zanetti, M., Colpani, G. L., Padoin, N., Soares, C., Fiori, M. A., & Riella, H. G. (2021). Synthesis of geranyl acetate by esterification of geraniol with acetic anhydride through heterogeneous catalysis using ion exchange resin. *Chemical Engineering Research and Design*, 168, 156–168. <https://doi.org/10.1016/J.CHERD.2021.01.031>
- Zhong, Y., Godwin, P., Jin, Y., & Xiao, H. (2019). Biodegradable Polymers and Green-based Antimicrobial Packaging Materials: A mini-review. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*. <https://doi.org/10.1016/J.AIEPR.2019.11.002>
- Zhu, Y., Romain, C. & Williams, C. (2016). Sustainable polymers from renewable resources. *Nature*, 354–362. <https://doi.org/10.1038/nature21001>

## CAPÍTULO 4

O estudo de caracterização dos filmes antimicrobianos de acetato de celulose com a incorporação do acetato de geranila foi submetido e está em avaliação, na revista *Carbohydrate Polymers*, com o título “*Cellulose acetate films with geranyl acetate: microbiological, thermal and mechanical performance*”, conforme apresentado a seguir.

### **Abstract:**

Antibacterial and antifungal cellulose acetate films were obtained with addition of 0.5% (v/v) and 1.0% (v/v) of geranyl acetate by the casting technique. The antimicrobial activities of the polymeric films were evaluated using the agar diffusion technique against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria and against *Aspergillus flavus* fungal. Chemical, thermal e mechanical characterizations of the films were also performed. The cellulose acetate films with geranyl acetate presented antibacterial and antifungal activities. Moreover, the addition of the geranyl acetate in the polymeric films was confirmed by FTIR and TGA technique, while DSC analysis pointed out the compatibility between the geranyl acetate and cellulose acetate. The addition of the geranyl acetate did not modify the mechanical behavior of the cellulose acetate films concerning stiffness and tensile strength. Thus, these results suggest that the new material is promising for future applications in biomedical devices and food packaging.

**Keywords:** Cellulose acetate; Geranyl acetate; Antimicrobial films.

### 4.1 INTRODUCTION

Polymer materials are widely studied and applied to different purposes due to their interesting features, like durability, non-toxicity, low cost and easy molding. The growing demand requires new sources of this materials, since the degradation process of conventional plastic is extremely slow, causing serious environmental problem by accumulation, increasing levels of land pollution and watercourse. These facts have been motivating the use of natural and biodegradable polymers, which can be degraded/composted after their use (Schaefer, Pavoni, Luchese, Faccin & Tessaro 2020).

This class of polymers represent a challenging opportunity, attracted an increasing interest to develop new biomaterials that can be suitable substitutes to conventional fossil base

polymers. It has highlighting in several areas, especially in biomedical (Santos et al., 2021; Sha et al., 2021; Tarrahi, Khataee, Karimi & Yoon, 2022) and food applications (Pereira et al., 2022; Teixeira et al., 2021; Xu et al., 2022) due to their structural and physical characteristics, as well as their safety, availability, biocompatibility and biodegradability (Irastorza. Zarandona, Andonegi, Guerrero & de la Caba, 2021; Nasrollahzadeh, Sajjadi, Iravani & Varma, 2021). These features raise as important factors, promoting a constant increase of studies in synthesis, incorporation of additives and novel applications.

In this context, cellulose acetate emerges as a promising alternative to obtain biomaterials to several purposes (Rajeswari, Christy, Swathi & Pius 2020; Zamel & Khan, 2021). It is a low cost organic ester biocompatible, biodegradable, nonirritating, nontoxic, readily available, with high chemical stability being used to obtain a broad range of materials, particularly membranes and films, due to its excellent mechanical properties (Jatoi; Kim & Ni, 2019; Santos et al., 2021; Ullah et al., 2021; Vatanpour et al., 2022).

This polymer has been extensively used in the biomedical area by means of membranes employed to improve the osseointegration, in tissue engineering and wound dressing (Liao et al., 2015; Lei et al., 2022; Pandele et al., 2017; Pandele et al., 2018; Sofi et al., 2021; Ullah et al., 2020; Voicu et al., 2016;). Also, such materials can be applied in hemodialysis process (Kee & Idris, 2010; Corobea et al., 2016; Waheed & Hussain, 2019) and to control drug delivery pathways (Rodrigues Filho et al., 2016; Castillo-Ortega et al., 2011; Mianehro, 2022; Milovanovic et al., 2016). Another trend is the development of active food packaging, a special kind of system that can play an active role in food quality (Assis et al., 2021; Dairi, Ferfera-Harrar, Ramos & Garrigós, 2019; Dannenberg et al., 2017; Pereira et al., 2022).

Aiming at biomedical and food packing applications, a desirable property of cellulose acetate materials concerns their antimicrobial activity. Once the former, have been used to control microbial infections (externally or internally), the later acts inhibiting or retarding microbial growth of pathogenic fungi and bacteria, reducing food contamination and increasing the shelf life of processed foods (Sofi et al., 2021; Al-Tayyar, Youssef & Al-hindi, 2020). The antimicrobial agent choosing to be incorporated in cellulose acetate films may present different characteristics, for example, metal particles and nanoparticles (Bruna, Galotto, Guarda & Rodríguez, 2014; Indumathi, Saral Sarojini & Rajarajeswari, 2019, Prakash et al., 2021) or



natural compounds of extracts and essential oils (Pereira et al., 2022; Pola et al., 2016; Santos et al., 2021; Ullah et al., 2021).

In a previously study, Celuppi et al. (2022), developed new cellulose acetate films with incorporation of geranyl acetate, an ester which is found in several essential oil with excellent antimicrobial properties (Djihane et al., 2017; Blažeković et al., 2018; Yi, Sun, Bao, Ma & Sun, 2019). In this study was the first time that a pure ester, which was synthesized by chemical route catalyzed by a commercial resin, had been incorporated in a natural biodegradable polymer. The results showed that this new material is able to inhibit both fungi and bacteria growth in its surface. Additionally, geranyl acetate is an antimicrobial agent classify as an edible aroma, present in the list of foods for human consumption, recognized as safe by the Food and Drug Administration (FDA), with low toxicity and good thermal stability (Zeferino, 2021). These properties are highly desirable mainly to biomedical and food packaging applications.

However, mechanical, thermal and chemical properties are the major parameters considered for the development of novel biomaterial since each requires specific features. Thus, this study was set up to confirm the antimicrobial behavior of cellulose acetate films by addition of 0.5% and 1.0% (v/v) of geranyl acetate and evaluated the effect of the antimicrobial agent on the main properties of the cellulose acetate films. Techniques such as infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC) and mechanical tests were used to characterize the films.

## 4.2 MATERIALS AND METHODS

### 4.2.1 Films preparation

Antimicrobial cellulose acetate films were prepared as described in a previous work (Celuppi et. al., 2022), using geranyl acetate ester synthesized by chemical route catalyzed by a commercial resin (Zeferino et al., 2021) and cellulose acetate (39.8% by weight of acetyl, average molar mass of approximately 30.000 g/mol, Sigma-Aldrich). To obtain the material, 0.2 g of cellulose acetate was diluted in acetone (9 mL) with 0.5% (v/v) and 1.0% (v/v) of geranyl acetate and the mixture was stirred for 1 hour in a shaker at room temperature. The solution was poured into a plate made of high-density polyethylene (HDPE) with hexahedral holes of 5x2x1 cm, taken to an oven and kept under 50 °C on a vacuum of 400 mmHg for 3

hours in order to evaporate the acetone (Synth, 100%). Thereafter, the films were removed from the plates. For comparative purposes, films without the incorporation of geranyl acetate were also produced.

Considering that all solvent present was evaporated and no geranyl acetate was lost during the acetone evaporation, it is possible to determine the mass percentage of geranyl acetate presented in each antimicrobial film, being that given, respectively, by: 17 wt% and 30 wt% for 0.5 % (v/v) and 1.0 % (v/v).

## 4.2.2 Films antimicrobial analysis

### 4.2.2.1 Antibacterial activity

The antibacterial activity of cellulose acetate films, with and without the geranyl acetate, was performed using the agar diffusion technique, following the methodology described by the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) with some adaptations. A circular sample of each film with 15 mm diameter was placed on the solidified agar with inoculum at a concentration of  $10^4$  CFU/mL. A gram-positive bacterium (*Staphylococcus aureus* - ATCC 25923) and a gram-negative bacterium (*Escherichia coli* - ATCC 8739) were used as reference.

The samples were kept at  $37 \pm 1$  °C into an oven during 24 hours and, after that, the inhibition halos diameter was measured. The tests were performed in triplicate and the inhibition halos diameter were subjected to the Tukey test in order to assess the significant differences ( $p < 0.05$ ).

### 4.2.2.2 Antifungal activity

To evaluate the antifungal activity of cellulose acetate films with and without the geranyl acetate, the methodology proposed by Celuppi et al., (2022) was followed, being the *Aspergillus flavus* defined as the reference specie for the test. The fungi growth was quantified by means of ASTM G21-15, as follow: none growth, 0% of the plate covered (rating 0); traces of growth, less than 10 % of the plate (rating 1); light growth, 10 up to 30 % of the plate (rating

2); medium growth, 30 up to 60% of the plate (rating is 3); heavy growth, 60% up to 100% of the plate (rating 4).

#### **4.2.3 Films microstructure**

The topology of the cellulose acetate films with and without geranyl acetate was analyzed using a scanning electron microscope (SEM) (Phenomworld, Phenom Pro X.). In order to visualize the film morphology, the images were captured with magnification of 400 times and electron beam energy of 15 keV.

#### **4.2.4 Thermal Behavior**

The cellulose acetate films were thermal characterized by Thermogravimetric Analysis (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). The thermogravimetric curves were obtained using a Netzsch STA 409EP thermogravimetric analyzer with a temperature program from 25 °C to 1000 °C and a heating rate of 10 °C/min. The thermal stability of the samples was evaluated by thermogravimetric curves (TG) and the TG derivative (DTG).

The DSC assays were performed in a Perkin Elmer system (model DSC 4000) using a nitrogen atmosphere with gas flow of 20 mL/min and a heating rate of 10 °C/min.

#### **4.2.5 FTIR analysis**

The chemical characterization was performed by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), to identify the functional groups presents in the films and to confirm the incorporation of geranyl acetate ester in the material. FTIR analysis was performed in an infrared spectrophotometer with Fourier transform (Agilent Technologies, model Cary 630 Series FTIR) by attenuated total reflectance with diamond crystal. The spectra were obtained in a range of 650 to 4000  $\text{cm}^{-1}$  with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.6 Mechanical tests

The mechanical behavior of the films was characterized by means of tensile experiments. In this regard, 50 mm length to 20 mm width samples (n=10 per composition) were subjected to displacement controlled tensile tests at 10 mm/min in a universal testing machine (Biopdi, MBio1) equipped with a 500 N load cell. The resulting curves are reported by the classical engineering stress and strain measures. The elastic moduli in the linear region of the curves and the stresses at failure were used to assess and, therefore, compare the stiffness and strength among compositions with and without geranyl acetate.

### 4.3 RESULTS AND DISCUSSIONS

#### 4.3.1 Antimicrobial analysis

##### 4.3.1.1 Antibacterial activity

Figure 4.1 and Figure 4.2 show the typical antimicrobial results from the diffusion tests obtained for the cellulose acetate film and for the cellulose acetate film with different percentage of geranyl acetate (0.5 v% and 1.0 v%), against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria, respectively. These bacteria were chosen since they are the representative species of the gram-positive e gram-negative microorganism group, respectively.

Figure 4.1 Microbiological results obtained from the diffusion tests for the cellulose acetate film and for the cellulose acetate films with different percentage of geranyl acetate against *Staphylococcus aureus*: (a) cellulose acetate film (control), (b) cellulose acetate film with 0.5 v% of geranyl acetate and (c) cellulose acetate film with 1.0 v% of geranyl acetate.

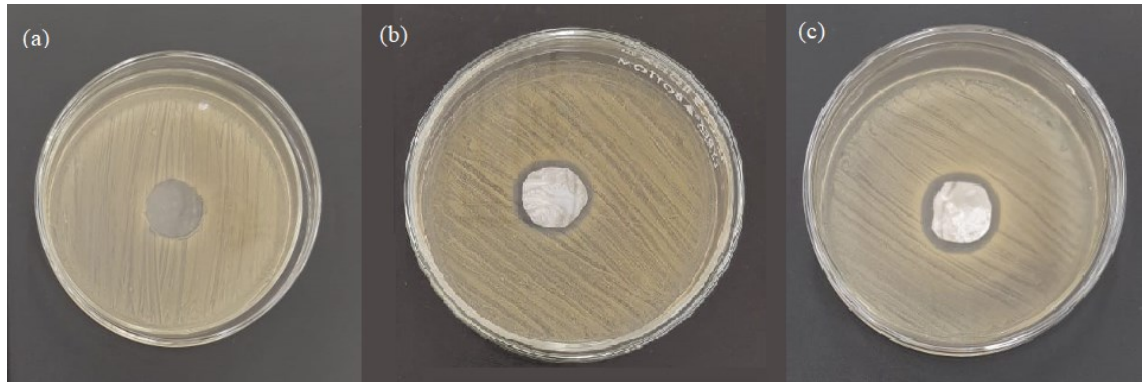
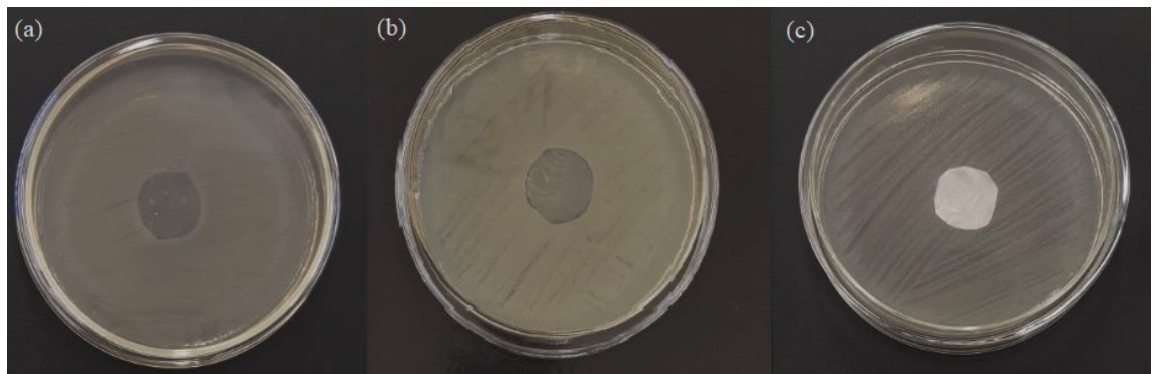


Figure 4.2 Microbiological results obtained from the diffusion tests for the cellulose acetate film and for the cellulose acetate films with different percentage of geranyl acetate against *Escherichia coli*: (a) cellulose acetate film (control), (b) cellulose acetate film with 0.5 v% of geranyl acetate and (c) cellulose acetate film with 1.0 v% of geranyl acetate.



After incubation, no inhibition zone was observed for the cellulose acetate films (control) for both *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, as shown in Figure 4.1a and in Figure 4.2a. The absence of inhibition bacteria halo indicates that the cellulose acetate films are not able to inhibit the bacterial growth. However, the microbiological results indicate that acetate cellulose films with the incorporation of geranyl acetate presents a good bacterial activity against *Staphylococcus aureus* and promote the reduction of the bacterial growth. For cellulose acetate film with 0.5 v% of geranyl acetate (Figure 1b), the inhibition halo diameter

was  $17.7 \pm 0.6$  mm, while for cellulose acetate films with 1.0 v% of geranyl acetate (Figure 4.1c) the inhibition halo diameter was  $27.3 \pm 0.6$  mm, Table 4.1.

Table 4.1 Inhibition halo diameter obtained by the cellulose acetate films and cellulose acetate films with 0.5 v% and 1.0 v% of geranyl acetate from the diffusion test against the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Microorganism	Inhibition halo diameter (mm)		
	CA	CA/0.5%GA	CA/1.0%GA
<i>Staphylococcus aureus</i>	$0.0 \pm 0.0^{Aa}$	$17.7 \pm 0.6^{Ba}$	$27.3 \pm 0.6^{Ca}$
<i>Escherichia coli</i>	$0.0 \pm 0.0^{Aa}$	$0.0 \pm 0.0^{Ab}$	$0.0 \pm 0.0^{Ab}$

Equal lowercase letters represent that there are no significant differences between rows ( $p < 0.05$ ) and equal uppercase letters represent that there are no significant differences between columns ( $p < 0.05$ ).

These results indicate that antimicrobial activity might be assigned exclusively to geranyl acetate, which even in low concentration (0.5 v%) was capable to inhibit the growth of the *Staphylococcus aureus* bacteria, confirming that the geranyl acetate aggregates the antimicrobial activity to the cellulose acetate films and the antibacterial activity also associate with its concentration. However, against *Escherichia coli* bacteria no antibacterial activity was observed for all cellulose acetate films studied. Therefore, the geranyl acetate did not provide significant inhibition halos, Figure 4.2 and Table 4.1.

In a recent study, Zeferino (2021) evaluated the antimicrobial activity of the geranyl acetate with agar diffusion tests against gram-negative and gram-positive bacteria. The results pointed out that geranyl acetate has excellent antibacterial activity against all the bacteria studied, which reinforces that the antibacterial activity of the acetate cellulose films is associated with the presence and release of the geranyl acetate. In this same study, the author reported lower inhibition halo for the gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, for example) confirming that this bacterium class is more resistant than the gram-positive one (*Staphylococcus aureus*, for example). Therefore, the absence or lower inhibition halos are expected for the cellulose acetate films against *Escherichia coli* bacteria.

The greatest resistance showed by gram-negative bacteria is often reported in the literature and could be attributed in part due to the structure of the bacterial cell wall

(Blažeković et al., 2018). In gram-negative bacteria, the cell wall is a complex envelope constituted by the cytoplasmic membrane, the periplasm and a thick layer of lipopolysaccharide outer membrane covering the cell wall, while in the gram-positive ones there is only a single peptidoglycan layer structure (Hsouna et al., 2011, Djihane et al. 2017, Zhang, Liu, Wang, Jiang, & Quek, 2016). Also, the divalent cations and polysaccharide part of lipopolysaccharide in the outer cell membrane of gram-negative bacteria have hydrophilic character which prevent the contact of hydrophobic constituents with the bacterial cell, resulting in a greater resistance of gram-negative bacteria from the ester (Ehsani et al., 2017).

Several antimicrobial essential oils obtained from different natural matrix have geranyl acetate as the majority component in its composition, which makes possible to associate this antibacterial characteristic due its presence. Studies evaluated the antimicrobial capacity from these essential oils with agar diffusion tests, getting good inhibitions results both gram-positive and gram-negative bacteria (Djihane et al., 2017; Blažeković et al., 2018; Yi et al., 2019).

Essential oils can affect the cellular structures of bacteria and their antibacterial compounds can penetrate through the cell wall and cause irreversible damage to the cytoplasmic membrane and the loss of internal cellular materials, which are important for maintaining cellular activities (Zhang et al., 2016). Such cell membrane damage can also increase the permeability of foreign compounds, which can disrupt many cellular activities, including energy production (membrane-coupled), transport across membranes, and other regulatory metabolic functions (Swamy, Akhtar & Sinniah, 2016). As the geranyl acetate is found in several essential oils, it is likely that the cell damage is the same of that describe above, justifying its antimicrobial activity when added in the cellulose acetate films.

For *Escherichia coli* bacteria, the antibacterial activity of cellulose acetate films was not verified with the agar diffusion test, Figure 4.2b and Figure 4.2c. However, this fact is not enough to claim that cellulose acetate films developed with geranyl acetate are not effective to eliminate the gram-negative bacteria growth. In a recently study, Celuppi et al. (2022) evaluated the inhibition capacity of bacteria growth by cellulose acetate films with 0.5 v% of geranyl acetate with diffusion tests, in the same way to performed in the present study. However, the authors confirmed the antibacterial activity on the surface of the films by counting surviving microorganisms over time tests (death curves). The authors showed that cellulose acetate films with geranyl acetate have an effective antibacterial activity for both *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Conversely, for the gram-negative bacteria, the time demanded to completed

elimination of microbial growth on the films surface was longer, corroborating with previous discussion about greater resistance presented by this class of microorganisms. In this sense, this study shows compelling evidence that a low amount of geranyl acetate migrates to the surface of cellulose acetate films, not being enough to cause inhibition halos, but sufficient to add the antibacterial activity against gram-negative bacteria to the polymeric films, in line with the data reported by Celuppi et. al., (2022).

#### 4.3.1.2 Antifungal activity

Figure 4.3 shows the microbiological results of fungus growth on the cellulose acetate films and on the cellulose acetate films with 0.5 v% and 1.0 v% of geranyl acetate.

Figure 4.3 Microbiological results with *Aspergillus flavus* fungus growth, (a) on the surface of the cellulose acetate films, (b) on the surface of cellulose acetate films with 0.5 v% of geranyl acetate and (c) on the surface of cellulose acetate films with 1.0 v% of geranyl acetate.



As can be seen in Figure 4.3a, the plate with the inoculum on the surface of the cellulose acetate film presented an abundant growth of *Aspergillus flavus* fungus, completely filling the plate surface, receiving grade 4 in the growth rating according classification of ASTM G21-15.

However, when was evaluated the fungus growth on the surfaces of cellulose acetate films with geranyl acetate, it was possible to verify that the fungus growth rating decreases even to lower ester concentration, 0.5 v%. The inoculum on this polymeric film (Figure 4.3b) receiving grade 3 in the growth rating, then the fungus cell density was reduced if compared with control plate, showing the capacity to inhibit fungal growth on the film surface containing 0.5 v% of geranyl acetate.



The antifungal activity of essential oils containing geranyl acetate as major compound also has been studied by several authors (Das et al., 2019; Das et al., 2022; Gonçalves et al., 2012; Maxia et al., 2009), being the *Aspergillus flavus* fungi one of the most used as a reference microorganism, since its association to food contamination during postharvest storage and generation of dangerous human health toxins (Das et al., 2022). The essential oils studied presented good antifungal activity against *Aspergillus flavus* which can be associated with the significant contribution of the geranyl acetate (Gonçalves et al., 2012).

Based on these facts, it is possible to associate the *Aspergillus flavus* growth reduction on surface of cellulose acetate films due to the presence of the geranyl acetate on its surface. The antifungal activity agrees with the inoculation on the cellulose acetate films with 1.0 v% of the geranyl acetate, Figure 3c. With this higher concentration of geranyl acetate, the cellulose acetate films presented a significant fungal growth reduction, being the plate filled with less than 10% of its surface with *Aspergillus flavus*, justifying the grade 1 in the growth rating, and proving an antifungal feature for the cellulose acetate films.

It seems that antifungal activity mechanisms of the geranyl acetate against fungi is similar of that verified against bacteria. Recently studies reported that the fungal plasma membrane is a possible target site for antifungal action (Das et al., 2019). Geranyl acetate is able to penetrate and break the cellular wall and the cytoplasmic membrane causing severe damage to membrane activity and also cell death (Swamy et al., 2016).

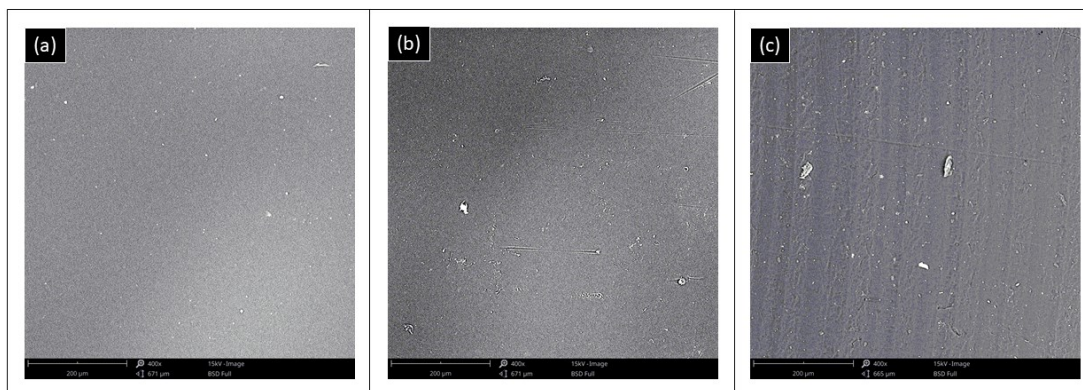
Even in low amount of geranyl acetate, the cellulose acetate films manifested antibacterial and antifungal activity. This is a very interesting feature for future applications of this polymeric material, especially in the biomedical and food packaging fields. Additionally, it is important to highlight that, in some cases, the antimicrobial activity was proved for the pure antimicrobial compounds added in the polymeric matrix, but these films did not exhibit this property (Moreira Gonçalves, Gomes Motta, Ribeiro-Santos, Hidalgo Chávez & Ramos de Melo, 2020), so they can not be applied for aforementioned purposes.

Considering many important future applications for the antimicrobial cellulose acetate obtained by the addition of geranyl acetate, some physical and chemical characterizations are important in order to assess whether the addition of geranyl acetate affect them, such as thermal and mechanical properties, for example.

### 4.3.2 Films morphology

The morphology study of the polymeric films was performed by SEM microscopy. In Figure 4.4 are shown the images of the surface of the cellulose acetate film with and without geranyl acetate, with magnification of 400 times. In Figure 4a is shown the image of the acetate cellulose film, while in Figure 4.4b and in Figure 4.4c are shown the image of the acetate cellulose film with 0.5 v% and wit 1.0 v% of geranyl acetate, respectively. The SEM images are important to evaluate the presence of significant defects that may be responsible for damage to mechanical and optical properties (Jiménez, Fabra, Talens & Chiralt, 2010).

Figure 4.4 SEM images obtained for surface of the cellulose acetate films. (a) Cellulose acetate film, (b) cellulose acetate film with 0.5 v% of geranyl acetate and (c) cellulose acetate film with 1.0 v% of geranyl acetate.



As shown in Figure 4.4, the cellulose acetate film (Figure 4.4a) showed no irregularities, aggregates and surface defects due to solvent evaporation, providing a smooth and homogeneous surface. With the addition of geranyl acetate, it appears that small irregularities, or very small aggregates, are formed on the surface after evaporation of the solvent, especially in the cellulose acetate film obtained with the highest concentration of geranyl acetate (1.0 v%). However, this effect is well distributed on the surface, which is a strong indication that geranyl acetate is evenly distributed in the cellulose acetate matrix, demonstrating the good miscibility of the antimicrobial active compound with the cellulose acetate matrix. The good distribution of geranyl acetate in cellulose acetate is an important

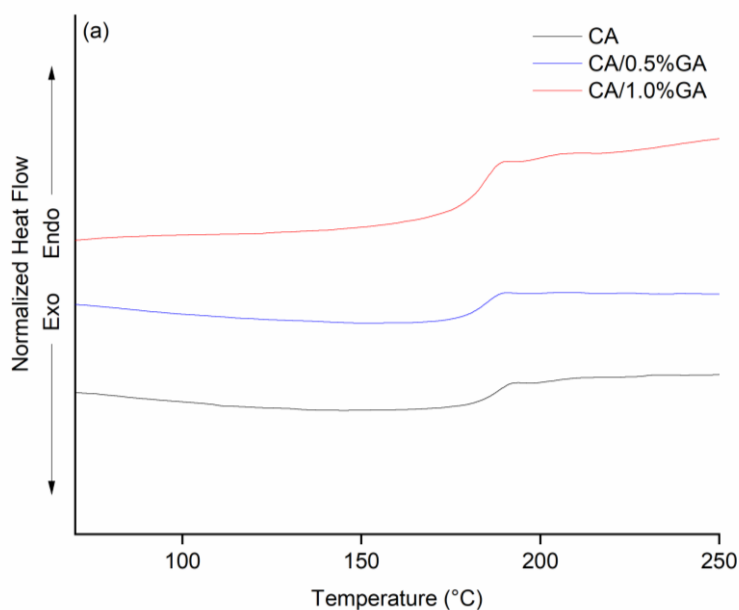
result, as it guarantees a uniform antimicrobial property on the surface of the cellulose acetate films.

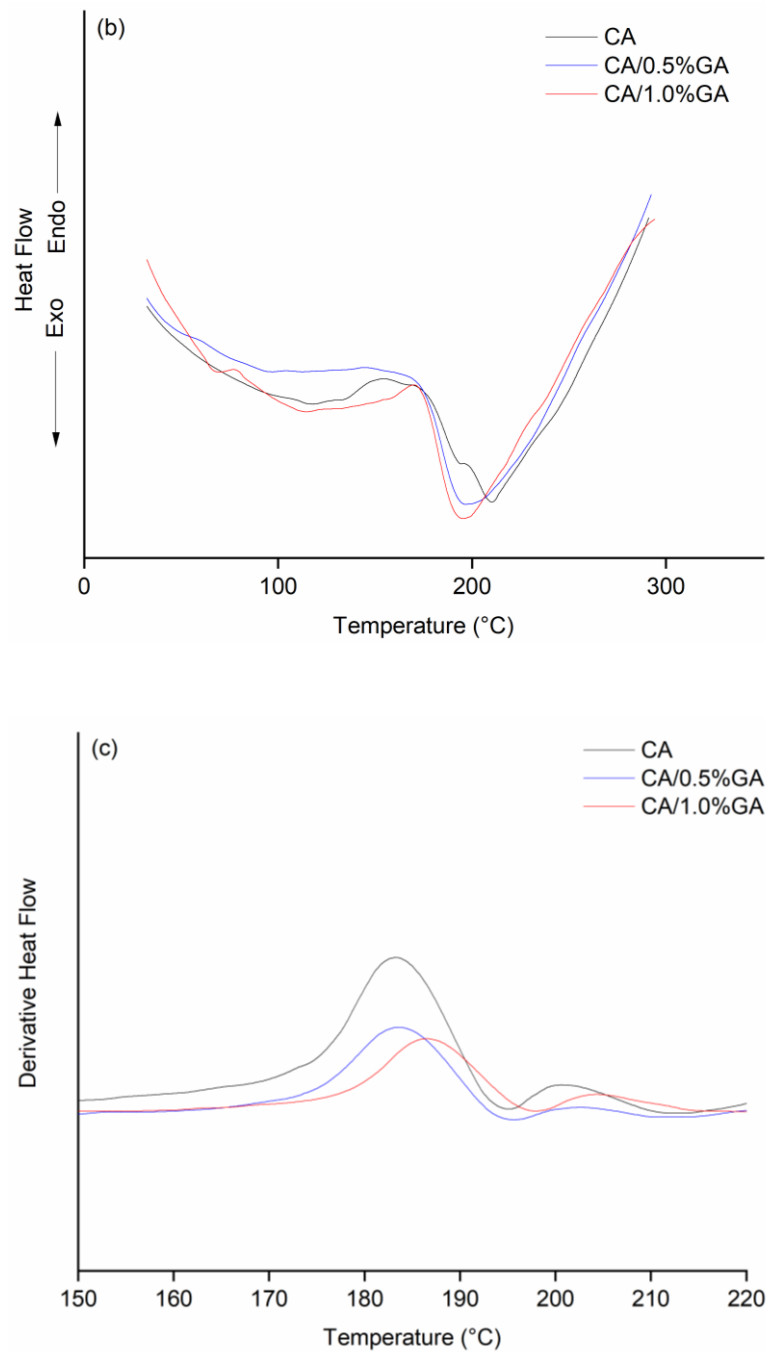
### 4.3.3 Thermal Behavior

#### 4.3.3.1 Differential scanning calorimeter (DSC)

The effect of addition of different concentration of the geranyl acetate on the thermal properties of the cellulose acetate films was evaluated by differential scanning calorimeter (DSC). In the Figure 4.5 are shown the respective thermograms.

Figure 4.5 DSC thermogram obtained for the cellulose acetate films (CA) and for the cellulose acetate films with 0.5 v% (CA/0.5%GA) and 1.0 v% (CA/1.0%GA) of geranyl acetate. (a) Second heating, (b) first cooling and (c) derivative of DSC second heating.





As shown in Figure 4.5a, the glass transition temperature ( $T_g$ ) of the cellulose acetate films without the incorporation of geranyl acetate was identified in about 181 °C. When geranyl acetate was added in films, no significantly change was observed in the  $T_g$ , which indicates that the presence of antimicrobial agent did not modified this thermal propriety of films, which exhibited only one, well defined global glass transition temperature both during heating (Figure 4.5a) and cooling (Figure 4.5b).

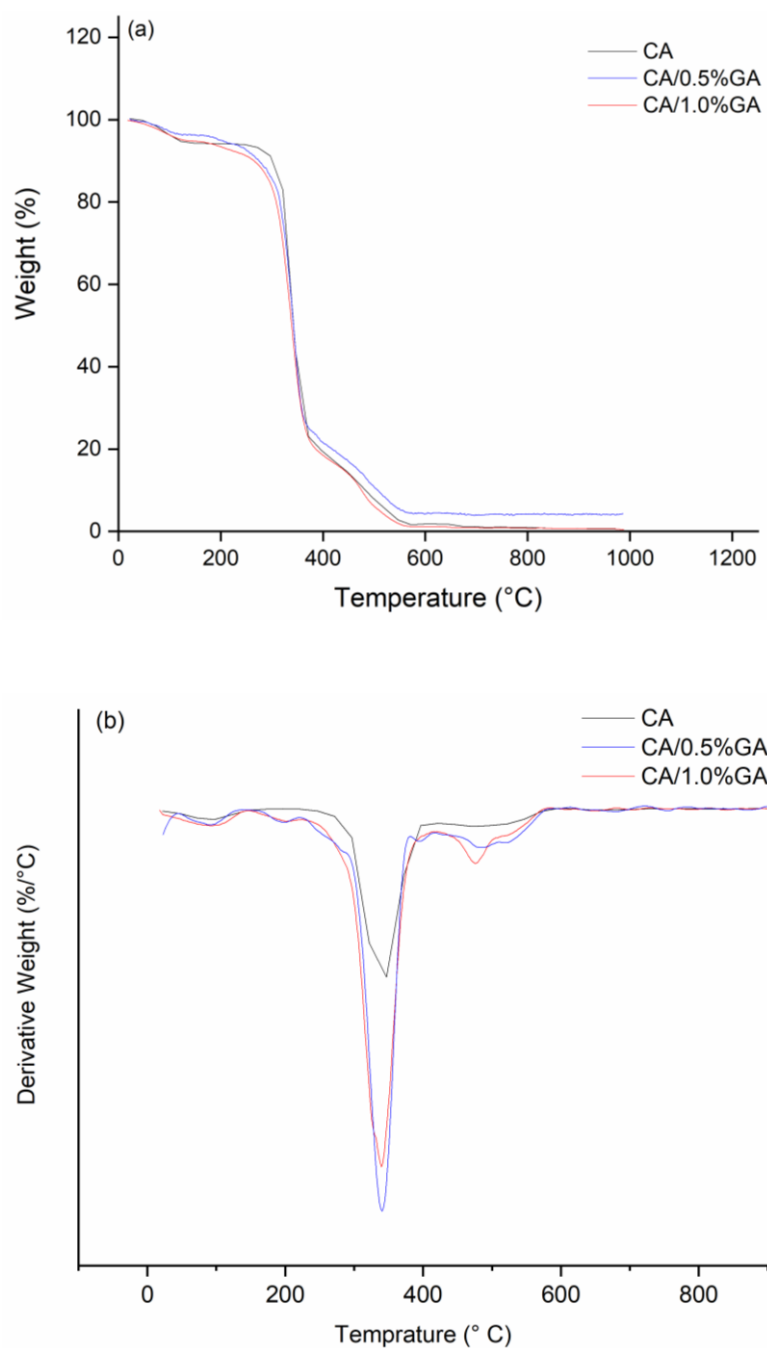
For the first cooling, Figure 4.5b, the T<sub>g</sub> for cellulose acetate films with and without geranyl acetate can be identify in about 195 °C. However, both identify T<sub>g</sub> (heating and cooling) are in agreement with the value previously reported in the literature (Gutierrez et al., 2017; Moreira et al., 2015; Pereira et al., 2022). The different value to T<sub>g</sub> founded for heating and cooling is mainly due to the hysteresis exhibited by the DSC curves from heating and cooling, Figure 4.5a and Figure 4.5b, respectively being that this behavior is an inherent aspect of the glass transition (Ruiz-Cabrera & Schmidt, 2015).

The baseline change shown in Figure 4.5a and Figure 4.5b is representative of a T<sub>g</sub>. This fact is supported by the Figure 4.5c, when the derivative of DSC heating curves were performed, since the glass transition presents features of a second-order transition, like can be seen. Moreover, no additional thermal transitions were observed with the DSC thermograms, which demonstrates that the polymeric matrix protects the geranyl acetate against temperature variations (Pereira et al., 2022).

#### 4.3.3.2 *Thermogravimetric analysis (TGA)*

The thermal stability and the thermal decomposition behavior of cellulose acetate films are shown with the thermogravimetric results and their respective derivatives curves (Figure 4.6a and Figure 4.6b). Firstly, one can observe that all polymeric films (with and without geranyl acetate) presented a low temperature weight loss corresponding to 3.9 – 5.7 wt%. This event takes place between the temperatures of about 30 °C and 146 °C, and it can be attributed to volatile matter and the evaporation of residual absorbed water that came from the film preparation and storage (Gutierrez et al., 2017; Teixeira et al, 2021). Temperatures of each weight loss are presented in Table 4.2.

Figure 4.6 (a) Thermogravimetric curves and (b) derivative thermogravimetric curves for the cellulose acetate films (CA) and for the cellulose acetate films with 0.5 v% (CA/0.5%GA) and 1.0 v% (CA/1.0%GA) of geranyl acetate.



The second event only occurred in the cellulose acetate films with geranyl acetate. The cellulose acetate films with 0.5 v% of geranyl acetate presented a significantly weight loss in

the temperature range of 172 °C to 234 °C, while the cellulose acetate film with 1.0 v% of geranyl acetate in the temperature range of 163 °C to 240 °C, both with maximum degradation rate around of 200 °C. According to Zeferino (2021), the geranyl acetate used in this study presented the maximum decomposition rate at 150 °C, so it can be possible to associate these thermal events in the cellulose acetate films with the geranyl acetate degradation. The higher degradation temperature found to the geranyl acetate in this study may be due to its entrapment in the cellulose acetate matrix, which protected the geranyl acetate molecules, corroborating with SEM and DSC results.

Table 4.2 Thermogravimetric analysis data of cellulose acetate films.

Sample	Step 1			Step 2		
	Temperature Range (°C)	DTG peak (°C)	Weight Loss (wt%)	Temperature Range (°C)	DTG peak (°C)	Weight Loss (wt%)
CA	21.9 – 146.9	87	5.7	-	No peak	0.0
CA/0.5%GA	42.6 – 128.6	88	3.9	172.0 – 234.0	198.6	2.4
CA/1.0%GA	30.0 – 137.7	85	5.2	163.0 – 240.0	199.7	3.7
Sample	Step 3			Step 4		
	Temperature Range (°C)	DTG peak (°C)	Weight Loss (wt%)	Temperature Range (°C)	DTG peak (°C)	Weight Loss (wt%)
CA	221.9 – 421.0	346	77.3	-	No peak	0.0
CA/0.5%GA	234.0 – 382.6	340	70.2	382.6 – 416.5	396.5	3.9
CA/1.0%GA	240.0 – 417.0	339	74.5	417.0 – 501.7	476.7	10.9
Sample	Step 5					
	Temperature Range (°C)	DTG peak (°C)	Weight Loss (wt%)			
CA	421.0 – 596.9	496.9	15.2			
CA/0.5%GA	416.5 – 584.6	492.0	15.7			
CA/1.0%GA	501.7 – 573.7	545.7	4.4			

This is an important result because it proves that the geranyl acetate was incorporated in the cellulose acetate films and it allows to estimate the mass percentage of geranyl acetate present in the polymeric films after the evaporation of the solvent. The weight loss in this temperature range for the cellulose acetate films with 0.5 v% and 1.0 v% of geranyl acetate are shown in Table 4.2, where the respective lost mass values are 2.4 wt% and 3.7 wt%. However, it is important to consider that an important mass fraction of the geranyl acetate may still be entrapped in the cellulose acetate matrix, so, an amount of geranyl acetate in films can be degraded with the polymer matrix at higher temperatures.

With higher temperatures two thermal events are associated to the thermal degradation of cellulose acetate matrix, with maximum degradation rate around 350 °C and 500 °C respectively, presents in all polymeric films (step 3 and step 5, respectively). This behavior is very similar to the thermal degradation of the cellulose acetate reported by Pinto et al. (2019) and by Pereira et al., (2022). The cellulose acetate presents low crystalline nature, anyway, it has good thermal stability owing to the presence of acetyl groups, with its thermal degradation starts only around 350 °C with the breakdown of glycosidic bonds in cellulose backbone, dehydration and depolymerization, and the loss of acetate groups (Sharma, Mandal & Goswami, 2021). Then, the cellulose acetate degradation has been reported between 300 °C and 400 °C (Pola et al., 2016; Pinto et al., 2019; Sharma et al., 2021, Teixeira et al., 2021). This main thermal decomposition event was identified in all polymeric films, with a weight loss around 70 wt% - 80 wt%.

However, something interesting occurs about 380 – 500 °C only for films with geranyl acetate (step 4). In this range of temperature, it was evident an intense peak of degradation for these films, which did not occur for pure cellulose acetate films. This fact probably is due to the degradation of remaining geranyl acetate ester, which was entrapped and protected into the cellulose acetate matrix. With the polymeric matrix being degraded, the geranyl acetate ester was released – only in this high temperature. This fact corroborates with DSC test, reinforcing the idea of protection of geranyl acetate by the polymeric matrix. The final stage of mass loss (step 5, about 500 °C) is related to degradation of the carbonaceous residue, resulting in the complete decomposition of the polymeric films (Pola et al, 2016; Pinto et al., 2019).



#### 4.3.4 Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR characterization

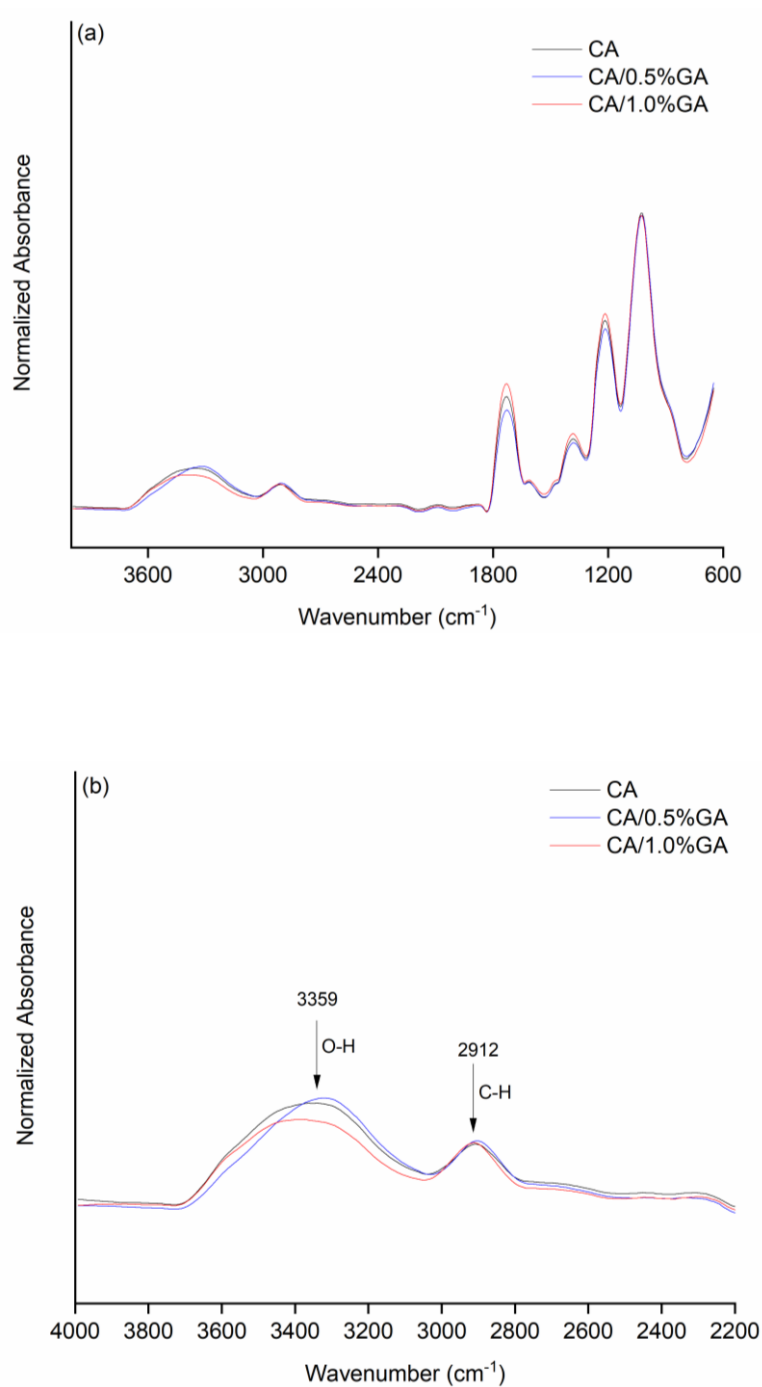
In the Figure 4.7a is shown the results obtained by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for the cellulose acetate films and for the cellulose acetate films with 0.5 v% and 1.0 v% of geranyl acetate. It is possible to notice that the absorption bands are very similar for all films and only a slight difference in some peaks can be seen. Cellulose acetate and geranyl acetate have similar chemical functional groups, such as ester groups and vinyl groups. Thus, similar FTIR spectra with few differences are expected.

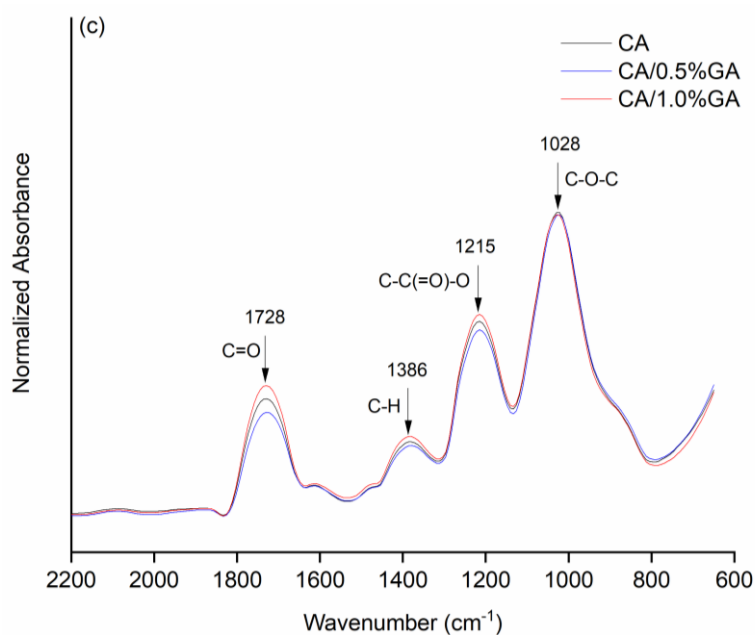
A broad band at  $3359\text{ cm}^{-1}$  in the FTIR spectrums, Figure 4.6b, was associated to the stretching vibrational modes of the OH groups. With the addition of the geranyl acetate in the cellulose acetate films the intensity of this band decreases, according to the Figure 4.7b. This interesting fact can be explained because the OH functional group is only present in the cellulose acetate molecules and when the geranyl acetate is added to the cellulose acetate matrix this functional groups is diluted and the intensity of this band decreases. Furthermore, this effect is more evident for the FTIR spectrums obtained for cellulose acetate films with 1.0 v% of geranyl acetate.

Also, in the Figure 4.7b, it is noticed a band at  $2912\text{ cm}^{-1}$  related to the CH stretching vibration. According to Figure 4.7c, characteristic bands for cellulose acetate are found in  $1028\text{ cm}^{-1}$  and in  $1386\text{ cm}^{-1}$ , which may be associate with the vibrational modes of the C–O–C binding and with the stretching vibrational modes of the C-H binding of  $-\text{CH}_3$  groups present in the cellulose acetate radicals. Other band in  $1728\text{ cm}^{-1}$  is noted due to the stretch vibrational modes of the carbonyl ester (C=O).

The low-intensity bands in  $1639\text{ cm}^{-1}$ ,  $1438\text{ cm}^{-1}$  and in  $1311\text{ cm}^{-1}$  correspond to the vibrational modes of the C=O binding, asymmetric angular deformation of the  $\text{CH}_2$  and to the symmetric angular deformation of the  $\text{CH}_3$  (Pereira et al.,2022; Pinto et al., 2019; Teixeira et al., 2021).

Figure 4.7 FTIR spectrums obtained for the cellulose acetate films (CA) and for cellulose acetate films with 0.5 v% (CA/0.5%GA) and 1.0 v% (CA/1.0%GA) of the geranyl acetate. (a) wavenumber range of 4000 to 600  $\text{cm}^{-1}$ , wavenumber range of (b) 4000 to 2200  $\text{cm}^{-1}$  and wavenumber range of (c) 2200 to 600  $\text{cm}^{-1}$ .





The functional groups of the acetate were observed in the FTIR spectrums for all samples, since these are the chemical base for the cellulose acetate and for the geranyl acetate. The similarity between the FTIR spectra is expected due to the fact that the geranyl acetate does not presents an exclusive and different functional group to cellulose acetate polymer, that is, the same functional groups present in geranyl acetate are also present in cellulose acetate, except for the OH groups. Both cellulose acetate and geranyl acetate are organic esters characterized by the presence of the characteristic functional group  $C-C(=O)-O$ , which can be identified in the band at  $1215\text{ cm}^{-1}$  (Figure 4.7c) (Pereira et al., 2022; Zeferino, 2021). As shown by FTIR spectroscopy there are no evidences of the new chemical bonds resulting by the interactions between cellulose acetate polymer and geranyl acetate molecules.

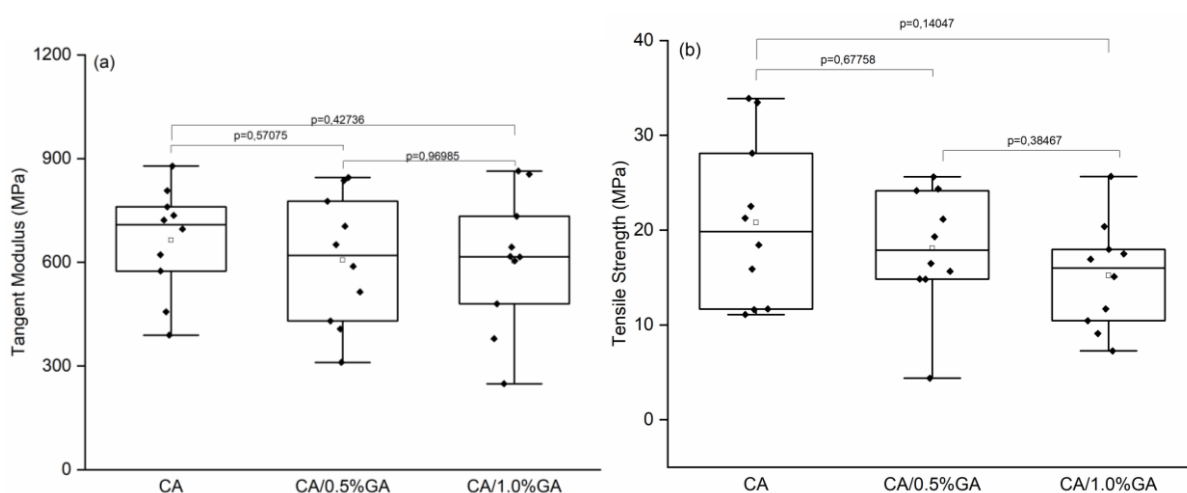
#### 4.3.5 Mechanical properties

The stress versus strain curves for cellulose acetate film and cellulose acetate films with 0.5 v% and 1.0 v% of geranyl acetate are very similar. The stiffness and tensile strength values determined for the cellulose acetate films and for cellulose acetate films with 0.5 v% and 1.0 v% of geranyl acetate are compared in Figure 4.8a and Figure 4.8b, respectively. It can be seen that no statistical significances ( $p < 0.05$ ) are verified for both mechanical behaviors

evaluated. Accordingly, one can infer that the addition of geranyl acetate does not alter these mechanical responses.

For the tangent modulus, Figure 8a, the cellulose acetate film presented value of 664.14 MPa ( $\pm 154.03$ ). This not differs from the cellulose acetate film with 0.5 v% and 1.0 v% of geranyl acetate and from cellulose acetate film with 1.0 v% of geranyl acetate, which present tangent modulus of 606.33 MPa ( $\pm 187.82$ ) and 603.85 MPa ( $\pm 197.76$ ), respectively.

Figure 4.8 Mechanical properties for the cellulose acetate films (CA) and for the cellulose acetate films with 0.5 v% (CA/0.5%GA) and 1.0 v% (CA/1.0%GA) of geranyl acetate. (a) Tangent Modulus and (b) Tensile strength.



Recently, Pereira et al., (2022) developed cellulose acetate membranes from banana pseudostem and evaluated the mechanical proprieties of these material. The authors reported lower values for the tangent modulus ( $31.32 \pm 2.80$  MPa) of the cellulose acetate membranes, likely due to different film processing.

For cellulose acetate films, a tensile strength of  $20.79 (\pm 8.69)$  MPa was found while for the films with 0.5 % of geranyl acetate and films with 1.0 v% of geranyl acetate a tensile strength of  $18.08$  MPa ( $\pm 6.34$ ) and  $15.20$  MPa ( $\pm 5.65$ ) was found, respectively (Figure 4.8b). Moreira Gonçalves et al., (2020) prepared cellulose acetate films with the addition of 50 w/v% of sweet fennel essential oil and obtained a tensile strength value of  $29.92 (\pm 0.39)$  MPa, similar to this study. Other studies reported in the literature used the cellulose acetate as a base for polymeric films and founded similar values for the tensile strength. This suggests that the tensile

strength obtained for the cellulose acetate with geranyl acetate are typical values (Bruna et al., 2014; Dairi et al., 2019; Wei, Song, Cheng & Yang, 2020).

According to Figure 4.8b, it is possible to observe that the maximum stress tends to decrease with the addition of the geranyl acetate, but this change is not significant, which can be associated to differences in the films thickness (Kaewprachu, Jaisan, Rawdkuen, Tongdeesoontorn & Klunklin, 2022). The casting method used to produce the cellulose acetate films does not allow precise control of the samples thickness, so this feature can increase data variability. The hydrophobic characteristic of geranyl acetate may have hampered its physical interaction with the cellulose acetate polymer matrix and so the possible non-miscible material characteristics also could help to explain all the heterogeneous mechanical behavior of the films (Moreira Gonçalves et al., 2020).

The cellulose acetate films in this study presented a highest elastic modulus, i.e., a stiffer material. This behavior can be associated with the  $\beta$ -d-glucose rings in its main chain, the strong hydrogen bonds between the hydroxyl groups. If necessary, it is possible to incorporate some additives such as plasticizers to increase the ductility, since this substance can cause changes in the polymer network of the films, with consequent to make it softer and more flexible (Montoille et al., 2021; Teixeira et al., 2021).

The main purpose of the cellulose films with the addition of the geranyl acetate concerns biomedical and food packaging applications, due to the excellent antibacterial and antifungal performance. However, some applications require good mechanical properties, as well, adequate mechanical strength and flexibility are important features for wound dressing in clinical handling, allowing the implants to adapt to irregular surfaces (Schaefer et al 2020; Ullah et al., 2021).

Moreover, in a review article, Khaneghah, Hashemi and Limbo (2017) analyzed several studies with incorporation of antimicrobial agents in polymeric base to obtain antimicrobial food packaging. For natural polymer-based films containing antimicrobial agents the tensile strength ranged for 0.96 to 33.82 MPa, very similar to that found in this study, suggesting a high potential for a possible food packaging application.

#### 4.4 CONCLUSION

In this study, different geranyl acetate concentration was incorporated within cellulose acetate films to obtain a novel antimicrobial material. Films presented excellent antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and the inhibition halo increased with the increase of ester amount, which allows associating the antimicrobial activity with the ester presence in the films. This fact was confirmed when fungi growth was evaluated and cellulose acetate films with 1.0 v% of geranyl acetate presented the lowest rate of microbial growth on its surface. Chemical and thermal analysis confirmed that geranyl acetate was incorporated to films, but there were not find evidences of new chemical bonds between cellulose acetate and geranyl acetate. The mechanical properties of cellulose acetate films were not modified by the geranyl acetate incorporation and, even that films showed dispersal results, which reflect their heterogeneity, it was possible to verify that tangent modulus and tensile strength found for all samples are in the acceptable range.

These results showed that geranyl acetate was indeed incorporated into the cellulose acetate films and the material obtained presented excellent antimicrobial properties, suggesting a potential use for biomedical devices and active food packaging. Thus, future prospect will be to promulgate more detailed studies about biocompatibility of this new material by undergoing a detailed in vitro and in vivo analysis. Moreover, there is an interests to develop a new antimicrobial packaging through specific tests for this purpose.

#### **Acknowledgements**

We thank Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI) - Blumenau (Brazil), in the person of Jocinei Dognini for providing the equipment and technical support for the FTIR and thermal analysis and Laboratory of Technology and Mechanical Characterization from Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI) - Joinville (Brazil) for SEM images. We also thank Laboratório de Materiais e Computação Científica (LabMAC) from UFSC, Laboratório de Materiais Multifuncionais (LMF) and Laboratório de Tecnologia e Processos de Materiais (LaTEM) from Unochapecó for the structure to accomplish this work.

## References

- Al-Tayyar, N. A., Youssef, A. M., & Al-hindi, R. (2020). Antimicrobial food packaging based on sustainable Bio-based materials for reducing foodborne Pathogens: A review. In *Food Chemistry* (Vol. 310). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125915>
- American Society for Testing and Materials – ASTM G21-15 Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi, 2015.
- Assis, R. Q., Pagno, C. H., Stoll, L., Rios, P. D. A., Rios, A. de O., & Olivera, F. C. (2021). Active food packaging of cellulose acetate: Storage stability, protective effect on oxidation of riboflavin and release in food simulants. *Food Chemistry*, 349. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129140>
- Blažeković, B., Yang, W., Wang, Y., Li, C., Kindl, M., Pepeljnjak, S., & Vladimir-Knežević, S. (2018). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Lavandula × intermedia* ‘Budrovka’ and *L. angustifolia* cultivated in Croatia. *Industrial Crops and Products*, 123, 173–182. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.06.041>
- Bruna, J. E., Galotto, M. J., Guarda, A., & Rodríguez, F. (2014). A novel polymer based on MtCu<sup>2+</sup>/cellulose acetate with antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, 102(1). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.038>
- Castillo-Ortega, M. M., Nájera-Luna, A., Rodríguez-Félix, D. E., Encinas, J. C., Rodríguez-Félix, F., Romero, J., & Herrera-Franco, P. J. (2011). Preparation, characterization and release of amoxicillin from cellulose acetate and poly(vinyl pyrrolidone) coaxial electrospun fibrous membranes. *Materials Science and Engineering: C*, 31(8), 1772–1778. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2011.08.009>

- Celuppi, L. C. M., Capelezzo, A. P., Cima, L. B., Zeferino, R. C. F., Zanetti, M., Riella, H. G., & Fiori, M. A. (2022). Antimicrobial cellulose acetate films by incorporation of geranyl acetate for active food packaging application. *Research, Society and Development*, *11*(1), e40111125141. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i1.25141>
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptible tests; Approved standard – Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, Pennsylvania, 2012.
- Corobea, M. C., Muhulet, O., Miculescu, F., Antoniac, I. V., Vuluga, Z., Florea, D., Vuluga, D. M., Butnaru, M., Ivanov, D., Voicu, S. I., & Thakur, V. K. (2016). Novel nanocomposite membranes from cellulose acetate and clay-silica nanowires. *Polymers for Advanced Technologies*, *27*(12). <https://doi.org/10.1002/pat.3835>
- Dairi, N., Ferfera-Harrar, H., Ramos, M., & Garrigós, M. C. (2019). Cellulose acetate/AgNPs-organoclay and/or thymol nano-biocomposite films with combined antimicrobial/antioxidant properties for active food packaging use. *International Journal of Biological Macromolecules*, *121*, 508–523. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.10.042>
- Dannenberg, G. da S., Funck, G. D., Cruxen, C. E. dos S., Marques, J. de L., Silva, W. P. da, & Fiorentini, Â. M. (2017). Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. *LWT - Food Science and Technology*, *81*, 314–318. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.04.002>
- Das, S., Singh, V. K., Chaudhari, A. K., Deepika, Dwivedy, A. K., & Dubey, N. K. (2022). Co-encapsulation of *Pimpinella anisum* and *Coriandrum sativum* essential oils based synergistic formulation through binary mixture: Physico-chemical characterization, appraisal of antifungal mechanism of action, and application as natural food preservative. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105066. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2022.105066>



Das, S., Singh, V. K., Dwivedy, A. K., Chaudhari, A. K., Upadhyay, N., Singh, A., Deepika, & Dubey, N. K. (2019). Antimicrobial activity, antiaflatoxigenic potential and in situ efficacy of novel formulation comprising of *Apium graveolens* essential oil and its major component. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *160*, 102–111.  
<https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2019.07.013>

de Carvalho EufrásioEuf, M., Pinto, E., David da Silva, D., Luiza Amorim Gomes, A., dos Santos Azevedo Leite, V., Robledo Fialho Moraes, A., Ferreira de Novais, R., Tronto, J., & Garcia Pinto, F. (2019). *Film based on magnesium impregnated biochar/ cellulose acetate for phosphorus adsorption from aqueous solution †*.  
<https://doi.org/10.1039/c8ra06655h>

Djihane, B., Wafa, N., Elkhamssa, S., Pedro, D. H. J., Maria, A. E., & Mohamed Mihoub, Z. (2017). Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *25*(5), 780–787.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.11.001>

dos Santos, A. E. A., dos Santos, F. V., Freitas, K. M., Pimenta, L. P. S., de Oliveira Andrade, L., Marinho, T. A., de Avelar, G. F., da Silva, A. B., & Ferreira, R. V. (2021). Cellulose acetate nanofibers loaded with crude annatto extract: Preparation, characterization, and in vivo evaluation for potential wound healing applications. *Materials Science and Engineering C*, *118*. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111322>

Ehsani, A., Alizadeh, O., Hashemi, M., Afshari, A., Aminzare, M., & Dvm, M. H. (2017). Phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of *Melissa officinalis* and *Dracocephalum moldavica* essential oils. In *ARTICLE Veterinary Research Forum* (Vol. 8, Issue 3).

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Title 21 - Food and drugs. Chapter I - Food and drug administration, department of health and human services. Subchapter B - Food for human consumption (continued). Part 182 - Substances generally recognized as

safe. Abril/2019. Acesso em: abril/2022. Disponível em:

<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.60&SearchTerm=geraniol..>

- Gonçalves, M. J., Cruz, M. T., Tavares, A. C., Cavaleiro, C., Lopes, M. C., Canhoto, J., & Salgueiro, L. (2012). Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. *Industrial Crops and Products*, 35(1), 166–171. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2011.06.030>
- Gutierrez, J., Carrasco-Hernandez, S., Barud, H. S., Oliveira, R. L., Carvalho, R. A., Amaral, A. C., & Tercjak, A. (2017). Transparent nanostructured cellulose acetate films based on the self assembly of PEO-b-PPO-b-PEO block copolymer. *Carbohydrate Polymers*, 165, 437–443. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.02.070>
- Hsouna, A. Ben, Trigui, M., Mansour, R. Ben, Jarraya, R. M., Damak, M., & Jaoua, S. (2011). Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 148(1), 66–72. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2011.04.028>
- Indumathi, M. P., Saral Sarojini, K., & Rajarajeswari, G. R. (2019). Antimicrobial and biodegradable chitosan/cellulose acetate phthalate/ZnO nano composite films with optimal oxygen permeability and hydrophobicity for extending the shelf life of black grape fruits. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.171>
- Irastorza, A., Zarandona, I., Andonegi, M., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2021). The versatility of collagen and chitosan: From food to biomedical applications. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 116). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106633>
- Jatoi, A. W., Kim, I. S., & Ni, Q. Q. (2019). Cellulose acetate nanofibers embedded with AgNPs anchored TiO<sub>2</sub> nanoparticles for long term excellent antibacterial applications.

*Carbohydrate Polymers*, 207, 640–649.

<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.12.029>

Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2010). Effect of lipid self-association on the microstructure and physical properties of hydroxypropyl-methylcellulose edible films containing fatty acids. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 585–593.

<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2010.05.014>

Kaewprachu, P., Jaisan, C., Rawdkuen, S., Tongdeesontorn, W., & Klunklin, W. (2022). Carboxymethyl cellulose from Young Palmyra palm fruit husk: Synthesis, characterization, and film properties. *Food Hydrocolloids*, 124.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107277>

Kee, C. M., & Idris, A. (2010). Permeability performance of different molecular weight cellulose acetate hemodialysis membrane. *Separation and Purification Technology*, 75(2), 102–113. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2010.08.013>

Lei, L., Huang, W., Liu, K., Liu, X., Dai, M., Liu, Z., & Zhiao, Y. (2022). Trilazad mesylate-loaded electrospun cellulose acetate nanofibrous wound dressings promote diabetic wound healing by modulation of immune response and protection against oxidative damage. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 69, 102863.

<https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2021.102863>

Liao, N., Unnithan, A. R., Joshi, M. K., Tiwari, A. P., Hong, S. T., Park, C. H., & Kim, C. S. (2015). Electrospun bioactive poly( $\epsilon$ -caprolactone)-cellulose acetate-dextran antibacterial composite mats for wound dressing applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 469.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.01.022>

Maxia, A., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Tuveri, E., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2009). Chemical characterization and biological activity of essential oils

- from *Daucus carota* L. subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast. *Fitoterapia*, 80(1), 57–61. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2008.09.008>
- Mianehro, A. (2022). Electrospun Bioscaffold Based on Cellulose Acetate and Dendrimer-modified Cellulose Nanocrystals for Controlled Drug Release. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 3, 100187. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100187>
- Milovanovic, S., Markovic, D., Aksentijevic, K., Stojanovic, D. B., Ivanovic, J., & Zizovic, I. (2016). Application of cellulose acetate for controlled release of thymol. *Carbohydrate Polymers*, 147, 344–353. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.03.093>
- Montoille, L., Morales Vicencio, C., Fontalba, D., Ortiz, J. A., Moreno-Serna, V., Peponi, L., Matiacevich, S., & Zapata, P. A. (2021). Study of the effect of the addition of plasticizers on the physical properties of biodegradable films based on kefiran for potential application as food packaging. *Food Chemistry*, 360. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129966>
- Moreira Gonçalves, S., Gomes Motta, J. F., Ribeiro-Santos, R., Hidalgo Chávez, D. W., & Ramos de Melo, N. (2020). Functional and antimicrobial properties of cellulose acetate films incorporated with sweet fennel essential oil and plasticizers. *Current Research in Food Science*, 3, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2020.01.001>
- Moreira, G., Fedeli, E., Ziarelli, F., Capitani, D., Mannina, L., Charles, L., Viel, S., Gignes, D., & Lefay, C. (2015). Synthesis of polystyrene-grafted cellulose acetate copolymers via nitroxide-mediated polymerization. *Polymer Chemistry*, 6(29), 5244–5253. <https://doi.org/10.1039/C5PY00752F>
- Mousavi Khaneghah, A., Hashemi, S. M. B., & Limbo, S. (2018). Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. In *Food and Bioproducts Processing* (Vol. 111). <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.05.001>

- Nasrollahzadeh, M., Sajjadi, M., Iravani, S., & Varma, R. S. (2021). Starch, cellulose, pectin, gum, alginate, chitin and chitosan derived (nano)materials for sustainable water treatment: A review. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 251).  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116986>
- Pandele, A. M., Comanici, F. E., Carp, C. A., Miculescu, F., Voicu, S. I., Thakur, V. K., & Serban, B. C. (2017). Synthesis and characterization of cellulose acetate-hydroxyapatite micro and nano composites membranes for water purification and biomedical applications. *Vacuum*, *146*, 599–605. <https://doi.org/10.1016/J.VACUUM.2017.05.008>
- Pandele, A. M., Neacsu, P., Cimpean, A., Staras, A. I., Miculescu, F., Iordache, A., Voicu, S. I., Thakur, V. K., & Toader, O. D. (2018). Cellulose acetate membranes functionalized with resveratrol by covalent immobilization for improved osseointegration. *Applied Surface Science*, *438*, 2–13. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2017.11.102>
- Pereira, N. R. L., Lopes, B., Fagundes, I. V., de Moraes, F. M., Morisso, F. D. P., Parma, G. O. C., Zepon, K. M., & Magnago, R. F. (2022). Bio-packaging based on cellulose acetate from banana pseudostem and containing *Butia catarinensis* extracts. *International Journal of Biological Macromolecules*, *194*, 32–41.  
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.11.179>
- Pola, C. C., Medeiros, E. A. A., Pereira, O. L., Souza, V. G. L., Otoni, C. G., Camilloto, G. P., & Soares, N. F. F. (2016). Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. *Food Packaging and Shelf Life*, *9*, 69–78.  
<https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2016.07.001>
- Prakash, J., Venkataprasanna, K. S., Bharath, G., Banat, F., Niranjana, R., & Venkatasubbu, G. D. (2021). In-vitro evaluation of electrospun cellulose acetate nanofiber containing Graphene oxide/TiO<sub>2</sub>/Curcumin for wound healing application. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *627*.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127166>

Rajeswari, A., Christy, E. J. S., Swathi, E., & Pius, A. (2020). Fabrication of improved cellulose acetate-based biodegradable films for food packaging applications. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 2. <https://doi.org/10.1016/j.enceco.2020.07.003>

Rodrigues Filho, G., Almeida, F., Ribeiro, S. D., Tormin, T. F., Muñoz, R. A. A., Assunção, R. M. N., & Barud, H. (2016). Controlled release of drugs from cellulose acetate matrices produced from sugarcane bagasse: monitoring by square-wave voltammetry. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 42(7). <https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1107093>

Ruiz-Cabrera, M. A., & Schmidt, S. J. (2015). Determination of glass transition temperatures during cooling and heating of low-moisture amorphous sugar mixtures. *Journal of Food Engineering*, 146, 36–43. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2014.08.023>

Schaefer, E. W., Pavoni, J. M. F., Luchese, C. L., Faccin, D. J. L., & Tessaro, I. C. (2020). Influence of turmeric incorporation on physicochemical, antimicrobial and mechanical properties of the cornstarch and chitosan films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.148>

Sha, D., Wu, Z., Zhang, J., Ma, Y., Yang, Z., & Yuan, Y. (2021). Development of modified and multifunctional poly(glycerol sebacate) (PGS)-based biomaterials for biomedical applications. In *European Polymer Journal* (Vol. 161). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110830>

Sharma, A., Mandal, T., & Goswami, S. (2021). Fabrication of cellulose acetate nanocomposite films with lignocellulosic nanofiber filler for superior effect on thermal, mechanical and optical properties. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 25, 100642. <https://doi.org/10.1016/J.NANOSO.2020.100642>

- Sofi, H. S., Akram, T., Shabir, N., Vasita, R., Jadhav, A. H., & Sheikh, F. A. (2021). Regenerated cellulose nanofibers from cellulose acetate: Incorporating hydroxyapatite (HAp) and silver (Ag) nanoparticles (NPs), as a scaffold for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering C*, 118. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111547>
- Swamy, M. K., Sayeed Akhtar, M., & Sinniah, U. R. (2016). *Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review*. <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>
- Tarrahi, R., Khataee, A., Karimi, A., & Yoon, Y. (2022). The latest achievements in plant cellulose-based biomaterials for tissue engineering focusing on skin repair. *Chemosphere*, 288. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132529>
- Teixeira, S. C., Silva, R. R. A., de Oliveira, T. V., Stringheta, P. C., Pinto, M. R. M. R., & Soares, N. de F. F. (2021). Glycerol and triethyl citrate plasticizer effects on molecular, thermal, mechanical, and barrier properties of cellulose acetate films. *Food Bioscience*, 42, 101202. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2021.101202>
- Ullah, A., Saito, Y., Ullah, S., Haider, M. K., Nawaz, H., Duy-Nam, P., Kharaghani, D., & Kim, I. S. (2021). Bioactive Sambong oil-loaded electrospun cellulose acetate nanofibers: Preparation, characterization, and in-vitro biocompatibility. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.257>
- Ullah, A., Ullah, S., Khan, M. Q., Hashmi, M., Nam, P. D., Kato, Y., Tamada, Y., & Kim, I. S. (2020). Manuka honey incorporated cellulose acetate nanofibrous mats: Fabrication and in vitro evaluation as a potential wound dressing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.237>
- Vatanpour, V., Pasaoglu, M. E., Barzegar, H., Teber, O. O., Kaya, R., Bastug, M., Khataee, A., & Koyuncu, I. (2022). Cellulose acetate in fabrication of polymeric membranes: A

review. *Chemosphere*, 295(February).

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133914>

Voicu, S. I., Condruz, R. M., Mitran, V., Cimpean, A., Miculescu, F., Andronescu, C., Miculescu, M., & Thakur, V. K. (2016). Sericin Covalent Immobilization onto Cellulose Acetate Membrane for Biomedical Applications. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4(3). <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01756>

Waheed, H., & Hussain, A. (2019). Effect of Polyvinyl Pyrolidone on Morphology and Performance of Cellulose Acetate Based Dialysis Membrane. *Engineering, Technology & Applied Science Research*, 9(1). <https://doi.org/10.48084/etasr.2491>

Wei, L., Song, J., Cheng, B., & Yang, Z. (2020). Synthesis, characterization and antibacterial properties of novel cellulose acetate sorbate. *Carbohydrate Polymers*, 243. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116416>

Xu, K., Li, Q., Xie, L., Shi, Z., Su, G., Harper, D., Tang, Z., Zhou, J., Du, G., & Wang, S. (2022). Novel flexible, strong, thermal-stable, and high-barrier switchgrass-based lignin-containing cellulose nanofibrils/chitosan biocomposites for food packaging. *Industrial Crops and Products*, 179(February), 114661. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114661>

Yi, F., Sun, J., Bao, X., Ma, B., & Sun, M. (2019). Influence of molecular distillation on antioxidant and antimicrobial activities of rose essential oils. *LWT*, 102. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.051>

Zamel, D., & Khan, A. U. (2021). Bacterial immobilization on cellulose acetate based nanofibers for methylene blue removal from wastewater: Mini-review. *Inorganic Chemistry Communications*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2021.108766>

Zeferino, R. C. F., Piaia, V. A. A., Orso, V. T., Pinheiro, V. M., Zanetti, M., Colpani, G. L., Padoin, N., Soares, C., Fiori, M. A., & Riella, H. G. (2021). Synthesis of geranyl acetate



by esterification of geraniol with acetic anhydride through heterogeneous catalysis using ion exchange resin. *Chemical Engineering Research and Design*, 168.

<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2021.01.031>

Zeferino, Rubieli Carla Frezza. Síntese de Acetato de Geranila e Acetato de Nerila Via Catálise Heterogênea com Resina de Troca Iônica e Caracterização dos Ésteres para Potenciais Aplicações como Aditivos Antimicrobianos. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química, Florianópolis, 2021, 202p. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/231154/PENQ0922-T.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>. Acesso em: 12/03/2022.

Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., & Quek, S. Y. (2016). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 59, 282–289. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2015.05.032>

## CAPÍTULO 5

A caracterização biológica dos filmes antimicrobianos de acetato de celulose com a incorporação do acetato de geranila foi submetido e está em avaliação na revista *Biomaterials Advances*, com estudo intitulado “*Biocompatibility of antimicrobial cellulose acetate polymeric films by incorporation of geranyl acetate ester*”, conforme segue.

### **Abstract:**

There is a growing interest in using biomaterials with antimicrobial properties that interact and incorporate into the organism to regenerate live tissues, function as wound dressing with therapeutic action, aid in bone prosthesis integrations, etc. Thus, the prominence of polymeric materials is remarkable. In this study the biocompatibility of cellulose acetate films (CA) with geranyl acetate (GA), an organic ester obtained from the geraniol which has antimicrobial activity, was evaluated according ISO 10993 standard based the *in vivo* testing. Geranyl acetate was incorporated on the cellulose acetate polymer with concentrations of 0.5% and 1.0% (v/v) and scaffolds of antimicrobial cellulose acetate were implanted subcutaneously in immunocompetent Wistar rats and after 7 and 21 days, histological analyses of the implanted tissue were performed. The hydrolytic degradation test was performed by *in vitro* assays. The results showed that the geranyl acetate did not cause any tissue damage/reaction in the animals and was not degraded over the days after implantation. Additionally, it was also observed that antimicrobial cellulose acetate did not have any significant mass loss during the 60 days it was immersed in phosphate-buffered saline and the geranyl acetate was not released to test medium. Thus, the antimicrobial agent added to the implant does not affect the cellulose acetate films stability when inserted in a simulated physiological medium. Therefore, the results demonstrate that the antimicrobial cellulose acetate films by incorporation of geranyl acetate ester are a stable and biocompatible materials when used in animals.

**Keywords:** Cellulose acetate films; Antimicrobial scaffolds; Implant stability; Histological analysis

## 5.1 INTRODUCTION

Biocompatible materials can be defined as those that interact with human tissues or organs, permitting their complete or partial functionality related to their surface and structural compatibility. The first one refers to the degree of adaptation of the material to the biological, chemical characteristics and surface, while structural compatibility considers the acceptance of the material's mechanical behavior (Axinte et al., 2019). They are widely used to replace missing biological parts or hard tissues (e.g., bones and teeth) and the soft ones (e.g., skin, blood vessels, cartilage, and ligaments) that are injured or damaged (Rajan, Subramanian, Arockiarajan, 2022).

Several biomaterials are currently being used to obtain scaffolds – structures implanted in organisms and act as matrices for cell growth, providing a stable environment. In addition, they also help tissue remodeling (Lapomarda et al., 2021; Lapomarda et al. al., 2020; Machalowski et al., 2022). According to Asadi et al. (2019), these structures should simulate the extracellular matrix in the morphological, biochemical, and mechanical aspects to improve cell adhesion, proliferation, and differentiation. They present properties such as biocompatibility, adjustable degradation rate with non-toxic degradation products, good porosity for transporting nutrients and waste, similarity to the structure of the target tissue, and appropriate mechanical strength.

A new biomaterial must be assessed on how it interacts placed in a living environment, and the essential requirement for these materials is inertia to the body environment. It is known that, when implanted in living organisms, biomaterials can trigger different reactions. However, many efforts have been made to ensure that the implanted materials are biocompatible and stimulate only minimal immune responses, not causing any adverse events (Modulevsky; Cuerrier; Pelling, 2016; Rajan, Subramanian, Arockiarajan, 2022).

A promising biomaterial must integrate the best material and biological properties to suit a specific application. Metals and alloys, ceramics, and polymers are reliable materials because they are well established and recognized as biomaterials. Polymeric materials are acquiring prominence due to their flexibility. They can be manufactured to meet the demands of different applications, such as solids, fibers, and films (Kang and Fang 2018). Cellulose acetate (CA) is among the most used polymers in materials production for medical applications. The main reasons are the renewable source of raw material, the good mechanical strength, and

the good thermal stability of this polymer. It is also sustainable, non-toxic, biocompatible, and is low cost compared to other polymers (Azhar et al., 2021; Ioniță et al., 2018; Pandeale et al., 2017; Pandeale et al., 2018).

The utilization of CA has been studied for various accomplishments in biomedical sciences. Among multiple factors of its application, CA materials are highlighted in tissue engineering for both soft and hard tissue restoration. They support structure in bone/cartilage restoration (Gouma et al., 2012; Lee et al., 2021; Tsiapla et al., 2018; Pandeale et al., 2018; Voicu et al., 2016), in heart valve tissues regeneration (Chainoglou et al., 2016), and skin repair (Nosar et al., 2016), for instance. It is widely studied to obtain CA membranes for hemodialysis (Athira; Mohanty; Nayak, 2020; Azhar et al., 2021; Kee; Idris, 2010), wound dressing (Vatankhah et al., 2014; Lei et al., 2022; Liao et al., 2015; Sofi et al., 2021; Sharaf et al., 2021), and systems to control the drug delivery (Castillo-Ortega et al., 2011; Mianehro, 2022; Milovanovic et al., 2016; Rodrigues Filho et al., 2016).

Considering that contamination of biomedical products by pathogenic bacteria, fungi, and viruses is one of the leading causes of hospital-acquired infections, which is a considerable concern to the healthcare system (Al-Saeedi et al., 2021; Sheridan et al., 2022), it is generally believed that the most challenging impediment to the utilization of CA materials in the medical field is its inability to eliminate the growth of harmful microorganisms. Consequently, when an antimicrobial agent is incorporated into the CA, it is expected that this characteristic will be manifested in the developed biomaterial, expanding its functional applications.

Products made with antimicrobial CA will then be protected from bacterial and fungal agents due to their antimicrobial action, which increases the health safety of those who may benefit from products made with this material. In special, medical devices made with antimicrobial cellulose acetate will mitigate or eliminate the proliferation of pathogens on their surface, which is a critical characteristic of materials used in this area. For instance, antimicrobial functionalized implants make microorganisms find it challenging to colonize their surfaces, preventing infections (Goma et al., 2017; Faria et al., 2022). Antimicrobial wound dressing can help in the healing process and reduce infections because microorganisms can easily penetrate and form wound infections ruling to the healing process delay and or even causing death. Therefore, the antimicrobial material plays an essential role in improving the patient's health status (Esmaeili et al., 2020).

Antimicrobial activity can be added to polymeric CA materials by incorporating different antimicrobial agents, especially metallic silver, zinc, and copper nanoparticles (Al-Saeedi et al., 2021; Aly; Ahmed, 2021; Esmaili et al., 2020; Sofi et al., 2021). However, most physicochemical methods of nanoparticle synthesis involve the use of chemicals potentially harmful to human health and the environment. The presence of these hazardous chemicals on the nanoparticles, even only in traces, makes them less suitable for biomedical applications (Augustine; Hasan, 2020).

In this sense, the incorporation of natural compounds in the polymeric matrix of CA, such as essential oil and natural extracts, has been standing out in recent research (Liakos et al., 2018; Santos et al., 2021; Sharaf et al., 2021; Ullah et al., 2020) and the antimicrobial properties of them are associated with their composition. Geranyl Acetate (GA) is an organic ester present as a major component in several essential oils. It presents antimicrobial activity (Djihane et al., 2017; Das et al., 2019; Yi et al., 2019), making this ester a potential antimicrobial additive when used in its pure form. In addition to the excellent antimicrobial activity, GA also presents greater thermal stability (compared to most essential oils) and low toxicity (Zeferino, 2022).

In a previous work carried out, the group (Celuppi et al., 2022) attested the antibacterial and antifungal activity of a new antimicrobial polymeric material of CA due the incorporation of GA. The material, obtained in the form of a film by the casting technique, showed excellent antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria and prevented the overgrowth of fungi. The antimicrobial characteristic of the new polymeric material was attributed to the presence of GA. Therefore, this preliminary result also drives the use of the antimicrobial polymeric material for biomedical purposes, highlighting the need for biocompatibility studies for this new and emerging biomaterial.

For the present paper, antimicrobial CA films with GA were produced through the casting technique. *In vivo* biocompatibility tests were performed through both a histopathological study of the tissue surrounding the implant and degradation tests in simulated physiological environment. Those tests aimed to assess whether incorporating the antimicrobial agent in the polymeric material would alter its biocompatible response.

## 5.2 MATERIAL AND METHODS

### 5.2.1 The cellulose acetate implants

As described previously (Celuppi et al., 2022), 0.2 g of CA were diluted in 9 mL of acetone to obtain the implants in the form of films. The GA was incorporated in the CA solutions with concentrations of 0.5% and 1.0% (v/v). The mixture was stirred for 1 hour in a shaker at room temperature, and then the solutions were poured into a plate made of High-Density Polyethylene (HDPE) with holes of 5 x 2 x 1 cm. The plates containing the films were taken to an oven, kept under 50 °C and vacuumed at 400 mmHg for 3 hours to evaporate the acetone. After solvent evaporation process, the resultant films were removed from the plates and cut into circles of 10 mm diameter for implantation in the animals (Carvalho et al., 2017, Gouvêa et al., 2015; Xie; Hung, 2019).

### 5.2.2 The animals

The Ethical Committee of the Community University of Chapecó Region (UNOCHAPECÓ) approved all experimental procedures (approval protocol 008/2021). Wistar rats (*Rattus norvegicus Albinus*) of both sexes (50:50 male:female ratio, 7–9 weeks old; n = 6 rats/group) were purchased from the Bioterium of the university (UNOCHAPECÓ) and bred in its facilities. All animals were kept at constant room temperature (22 °C) and humidity (40 and 60%). They were fed with pellet feed for rats and mice in a regular chow diet and kept under a controlled 12 hours light/dark cycle having *ad libitum* water.

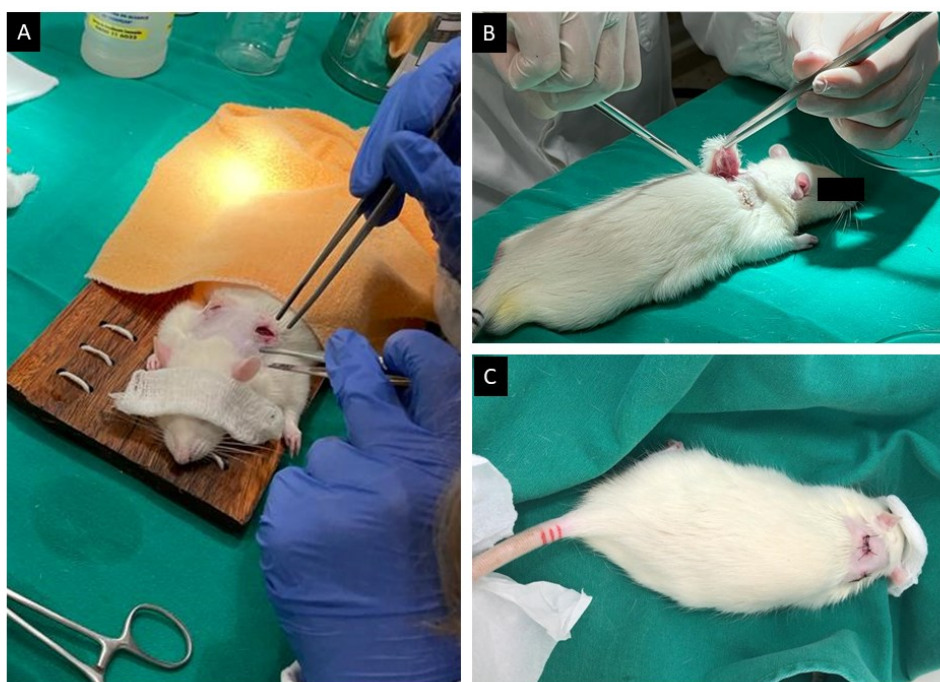
### 5.2.3 The implant of the Cellulose Acetate Films

The animals received intraperitoneally injected anesthesia with the association of xylazine and ketamine at doses of 10 mg/kg and 75 mg/kg, respectively. In order to avoid pain at the mice's application site, lidocaine was injected subcutaneously at a dose of 7 mg/kg. Once the effect of anesthesia was confirmed, the trichotomy of the animal's dorsum was performed with a trichotomy apparatus. After that, two 20 mm incisions were made in each individual's

upper dorsal region, creating "subcutaneous pouches" in which the implants were executed, Figure 5.1A. The antisepsis of the incision sites was made with a 2% chlorhexidine solution.

The objective of this experiment was to compare the tissue response of the material tested (CA films with the addition of GA at concentrations of 0.5% and 1.0% v/v) with the CA films without the addition of GA (control), known to be biocompatible (Pandele et al., 2018, Ullah et al., 2020). Then, the material to be tested was implanted in the right upper dorsal region, while the control material was implanted in the left upper dorsal region, Figure 2.1B. Both materials under analysis consisted of circular films with a diameter of 10 mm, which were previously sterilized utilizing UV light for 30 minutes (Modulevsky; Cuerrier; Pelling, 2016; Federal University of São Paulo, 2017).

Figure 5.1 Films implantation in rats; (A) skin removal; (B) biomaterial implantation; (C) rat in recuperation after surgical procedure.



After implantation, the incisions were sutured with 3-0 nylon thread, and the 2% chlorhexidine solution was applied again to avoid infection at the site. The animals' body temperature was maintained using heated gel bags to avoid hypothermia in the postoperative period, Figure 2.1C. The animals were observed throughout the postoperative period and



medicated with subcutaneous tramadol (10 mg/kg) every 12 hours and oral dipyrone (150 mg/kg) every 12 hours for analgesia, during 72 hours or as needed (Federal University of São Paulo, 2017).

#### **5.2.4 Tissue Removal**

After 7 and 21 days after implantation of the films, the rats were euthanized by deep anesthesia with sodium thiopental (120 mg/kg) preceded by lidocaine (7 mg/kg), as recommended by guidelines of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, 2018).

The upper back skin parts of the animals containing the film samples to be analyzed were cut, including the samples of the polymeric CA implants. They were located and measured after the analysis time had elapsed. The tissues were put in fixation with 10% buffered formalin and then sent for histopathological analysis in a private laboratory (Laboratory Volta Grande) in Chapecó, Santa Catarina, south Brazil (Federal University of São Paulo, 2017; National Council for the Control of Animal Experimentation, 2018; Modulevsky; Cuerrier; Pelling, 2016).

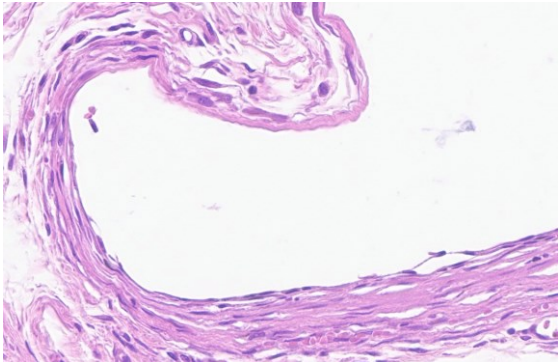
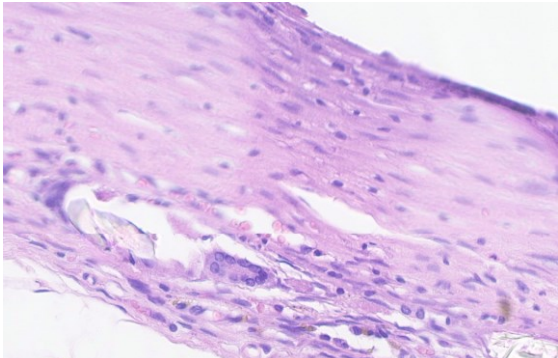
#### **5.2.5 Histological Analysis**

Skin samples preserved in 10% buffered formalin were processed by the routine technique of embedding in paraffin wax, submitted to serial microtomy and staining by the hematoxylin-eosin technique – HE (Luna, 1968) for microscopic evaluation.

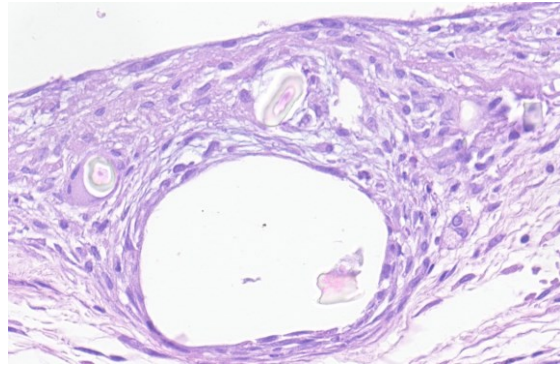
The inflammatory process at the implant site and its surroundings were evaluated, and the living organism response to the implanted material was determined by quantifying the lymphohistiocytic/granulomatous to pyogranulomatous infiltrate in the superficial dermis of the implant area, with a score assigned as described in Table 5.1. The microscopical evaluation of the samples was performed by a histopathologist blind to the composition of the implants.



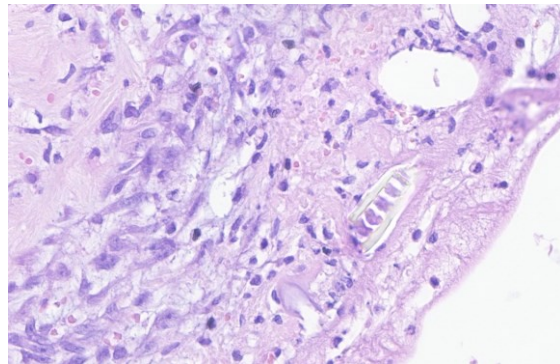
Table 5.1 Description of the scores used to quantify the infiltrate in the superficial dermis of the implant area.

Score	Description	Standard <sup>1</sup>
0	Absence of injury	
1	There is a discrete focally extensive lymphohistiocytic/granulomatous to pyogranulomatous inflammatory infiltrate in the superficial dermis.	

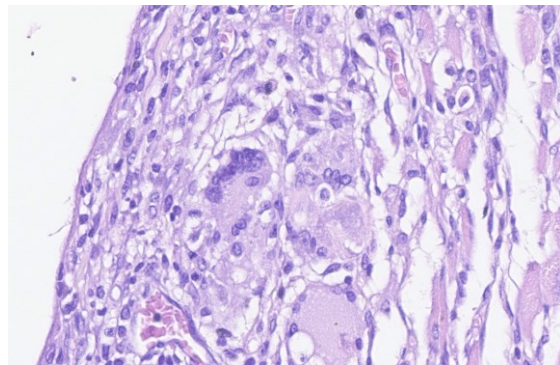
- 2 A mild focally extensive lymphohistiocytic/granulomatous to pyogranulomatous inflammatory infiltrate is observed in the superficial dermis.



- 2,5 A mild to moderate focally extensive lymphohistiocytic/granulomatous to pyogranulomatous inflammatory infiltrate is observed in the superficial dermis.



- 3 There is a moderately extensive focally extensive lymphohistiocytic/granulomatous to pyogranulomatous inflammatory infiltrate in the superficial dermis.



3,5	A focally moderate, severe, and extensive lymphohistiocytic/granulomatous to pyogranulomatous inflammatory infiltrate is observed in the superficial dermis.	Unavailable <sup>2</sup>
-----	--	--------------------------

---

<sup>1</sup> Optical microscopy magnification: 400 X; <sup>2</sup>The 3.5 score was not detected in the slides analyzed.

### 5.2.6 Degradation Test - Hydrolytic Degradation

The degradation test allows anticipating the degradation standpoint of the films and verifying if the material under study presents structural stability during its period of use in living systems. The ISO 10993 standard points tests that can provide preliminary information. The hydrolytic degradation is carried out in a simulated physiological environment - phosphate-buffered saline (PBS) solution with pH ~7.4 - widely performed in recent studies of materials biocompatibility (Nosar et al., 2016; Tsiapla et al., 2018; Sofi et al., 2021).

The CA implants with and without GA were subjected to degradation in PBS to investigate the degradation behavior. The CA polymeric film samples prepared with and without GA were cut into approximately 10 x 10 mm dimensions, sterilized using a UV light for 30 minutes and weighed on an analytical balance. After that, the samples under analysis were immersed in a test tube containing 5 mL of PBS.

The test tubes were kept in an oven at 37 °C for 60 days. On days 9, 15, 30, 45, and 60, the samples were removed from the solution and washed with distilled water. Excess moisture was removed with paper, and then the samples were kept in a desiccator for 24 hours to remove residual moisture. Finally, they were weighed on an analytical balance.

After weighing, the samples were replaced in the test tube with a new PBS solution, and the process was repeated on the next weighing date. The test was performed in triplicate, and the percentage of mass variation was calculated using Equation (1):

$$\text{Weight loss (\%)} = \frac{W^{\circ} - W}{W^{\circ}} \times 100 \quad (1)$$

Where  $W^{\circ}$  = initial dry weight of the sample and  $W$  = dry weight after removal from the degradation media (Nosar et al., 2016; Tsiapla et al., 2018; Sofi et al., 2021).

After 60 days of contact with the fluid under analysis, a sample of each component of the films was removed and taken for Scanning Electron Microscopy (SEM) (Phenomworld, Phenom Pro X.) to analysis the superficial morphology of the CA films with and without GA after the degradation test. In order to visualize the film morphology, the images were obtained with magnification of 400 times and with electron bean energy of 15 keV.

### 5.2.7 Geranyl Acetate Release

Considering that the implants were developed to be inserted in live organisms, it was necessary to confirm if the GA could be released by the material during its use, and consequently accessing the biological matrix. The release of the GA from the CA films was measured by the total immersion method into PBS solution (pH ~7.4), in which samples of polymeric film implants with 0.5% and 1.0% v/v of GA. The samples measuring 10 x 10 mm were immersed in 5 mL of PBS and kept under 37 °C in an oven during 60 days. After this period, the samples of polymeric film implants were removed from PBS and the solution was analyzed to detect the presence of the GA by release of the CA films (Ullah et al., 2021).

The amount of GA released was investigated through UV–vis spectroscopy (Pereira et al., 2022) at  $\lambda = 336$  nm, using a calibration curve with  $R^2 = 0.995$  and obtained for the concentration range between 0.5–10 mg/mL).

### 5.2.8 Statistical Analysis

Statistical analyses were performed by one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc comparison using GraphPad Prism 8.0.1 software. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Data are shown as mean  $\pm$  standard deviations.

## 5.3 RESULTS AND DISCUSSIONS

This study examined the *in vivo* biocompatibility of a new antimicrobial biomaterial of cellulose acetate (CA) incorporated with geranyl acetate (GA) ester. To this end, CA films

were subcutaneously implanted in immunocompetent rats to assess their biocompatibility. Additionally, degradation tests in a simulated physiological medium were carried out according to the ISO 10993. The main goal of these tests is to protect humans from future biological risks resulting from medical devices or materials usage (Wsoo et al., 2020).

Biomaterials must be biocompatible for biological purposes (Agarwal et al., 2020; Jurak et al., 2021; Liang et al., 2022). Experimental studies and histological analysis from the implant site of the materials allow the evaluation, at least in part, of the biomaterials' safety. Likewise, histological analysis permits the evaluation of the organisms' inflammatory response and is an approach for looking for non-toxic materials that promote a lower reaction to the host's immune system, as well as the repair of injured tissue and wound healing (França et al., 2013; Kang; Fan, 2018; Umar et al., 2021).

The polymeric material used in our study presents excellent antimicrobial properties, already presented by our research group (Celuppi et al., 2022). In this sense, we demonstrated that the CA biomaterial incorporated with GA could inhibit bacterial growth on its surface for both Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi. Showing such makes this material very useful for biomedical devices used in direct contact with living tissues, applied either externally and/or internally. It also contributes to keeping harmful microorganisms away from the exposed region and avoiding microbial infections near its application (Sofi et al., 2021). This important antimicrobial property is only manifested due to the incorporation of GA into the CA.

Studying new antimicrobial agents to be incorporated in a polymeric matrix is desirable mainly because of the excessive and indiscriminate use of conventional antibiotics over the past few decades, contributing to antibiotic resistance. Furthermore, antibiotics only prevent the infection instead of speeding tissue regeneration, so new approaches for antimicrobial agents which can be incorporated into biocompatible polymers need to be evaluated (Sofi et al., 2019; Ullah et al., 2021).

Indeed, the implantation of a biomaterial, whichever it is, triggers several responses of different degrees (Flaig et al., 2020; Figueiredo et al., 2013; Song, Winkeljann, Lieleg, 2020). The biocompatibility of CA is well-documented in several studies about this biomaterial, which is widely used to obtain different biomedical devices. When a different compound is added to a polymer matrix, biocompatibility can be modified or compromised. Consequently, it is crucial to find a balance between antibacterial ability and biocompatibility when designing new

antimicrobial materials to be used in biomedical devices and implants (Wu et al., 2022). So far, no study has evaluated the process of incorporating a pure antimicrobial ester in a biocompatible polymeric matrix, evidencing the relevance of the present work.

### **5.3.1 Implantation of Cellulose Acetate Films**

After the surgical procedure for the implantation of CA films, there were no cases of rats exhibiting any behavior that could characterize pain or discomfort induced by the films implantation throughout the study. There was no formation of edema or gross changes in animals' behavior. Moreover, none of the animals displayed visible inflammation or infection or any incompatibility issues, and there were no deaths of rats due to material rejection.

Modulevsky, Cuerrier, and Pelling (2016) developed cellulose scaffolds derived from apples in a similar study. Those scaffolds were decellularized and implanted subcutaneously in mice to assess their biocompatibility. The results demonstrated that those materials are biocompatible and exhibit a promising potential for biomedical applications. During the experimental procedure, the authors related that there was no mice death. No implant rejection or discomfort symptoms were found, characterized as successful implantation. This way, it is possible to confirm that the surgical process performed in our study was great and that the animals behaved normally.

### **5.3.2 Biocompatibility and cell infiltration in cellulose acetate films implant**

It can be seen in Figure 5.2 that seven days after implantation of the polymeric cellulose acetate material, the infiltrate is characterized as lymphohistiocytic/granulomatous to pyogranulomatous inflammatory and varies from mildly focally extensive (score 2) to mild-moderate focally extensive (score 2 to 2.5) in the three groups (control, 0.5% v/v and 1.0% v/v). The score is based further on the intensity of the inflammatory cells than on their composition.

The pictures in Table 5.2 illustrate representative cell infiltrates from animals in each group. For the control group (Table 5.2, images 5.2A, G, M, and S) and group 0.5% v/v (Table 5.2, images 5.2B, H, N, and T), the specific infiltrate was characterized as score 2. It is a mild infiltrate containing more lymphocytes [yellow arrow], macrophages and bulky macrophages (epithelioid macrophage) [blue arrow], and neutrophils. They classify the infiltrate as



granulomatous or pyogranulomatous and the presence of some multinucleated giant cells [blue arrow]. Fibroplasia and neovascularization with the formation of capillaries are identified by vascular endothelium and erythrocytes presence in the lumen) [red arrow] were also noted.

Regarding the inflammatory process and phases, the existence of macrophages, lymphocytes, and neutrophils in the tissue is noteworthy since they contribute to the repair by secreting cytokines and growth factors (Boothby; Cohen; Rosenblum, 2020; Flaig et al., 2020; Peiseler; Cubes, 2019). It is important to highlight that the lymphocytes are important biocompatibility markers, as they contribute to the inflammatory process, immune response, and response against the foreign body, which are significant in assessing biocompatibility (Boye et al., 2022). Also, macrophages are present in the inflammatory process. They perform phagocytosis, regulate pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators, and produce and release chemical mediators (Minutti et al., 2017).

The neutrophilic component found may be related to the ulcerated surface lesion due to scratches and licks by the animal due to the suture. Therefore, the presence of the polymer does not seem to cause ulceration directly, but the process of healing and the interferences of the animal as a whole. Jones et al. (2016) and Peiseler and Kubes (2019) affirm that these cells are part of acute inflammation. They are responsible for clearing debris and participating in the tissue repair process. In such cases, they are present as a result of possible ulceration caused by the behavior of the animals. Caetano (2012) carried out an experiment to evaluate the ability of a chitosan-alginate biomembrane in ulcer healing in rats, demonstrating the participation of neutrophils in the inflammatory process triggered by skin ulcers.

The mediators stimulate neovascularization and influence the activity of fibroblasts, which are responsible for synthesizing the components of the extracellular matrix (e.g., collagen), thus contributing to the deposition of the extracellular matrix. Moreover, lymphocytes also act as mediators, secreting cytokines, which modulate tissue repair processes (Boothby; Cohen; Rosenblum, 2020; Junqueira; Carneiro, 2008; Koo; Garg, 2019; Minutti et al., 2017; Schuster et al., 2021).

Figure 5.2 Comparison between histopathological examinations obtained for cellulose acetate implants collected on days 7 and 21 after surgical implantation.

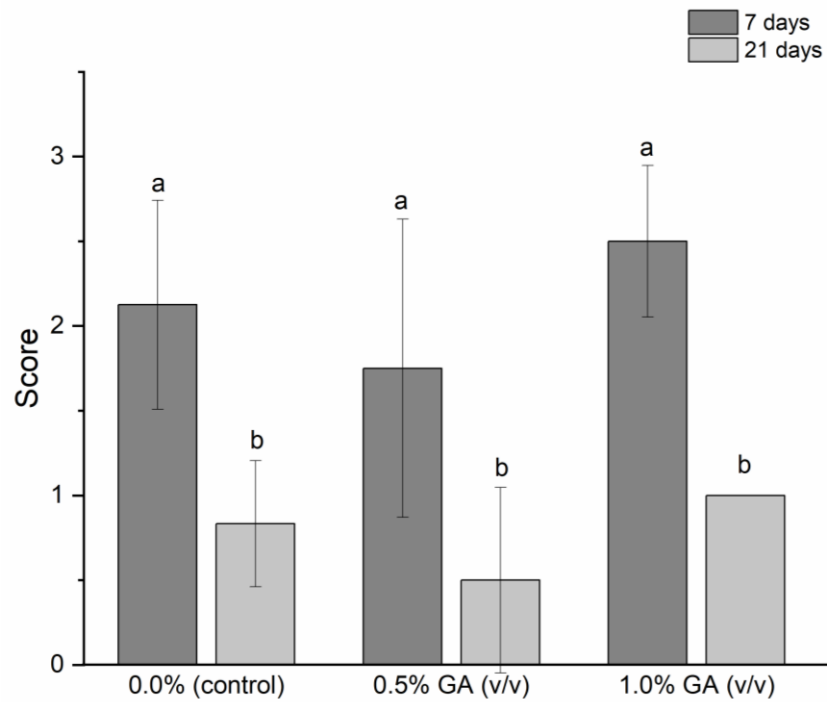


Table 5.2 Results of histological analysis of the rats' subcutaneous tissue 7 or 21 days after the implantation of control material or films containing 0.5% or 1.0% v/v of GA.

7 days			21 days		
0.0% (control)	0.5% GA (v/v)	1.0% GA (v/v)	0.0% (control)	0.5% GA (v/v)	1.0% GA (v/v)

Optical microscopy magnification: A-F = 20X, G-L = 40X, M-R – 200X, S-X – 400X.



The histological analysis of the animal in the 1.0% (v/v) group (Table 5.2, images C, I, O, U) was classified with a score of 2.5, a mild to moderate infiltration. A region of crust close to the epidermis can be seen as related to the ulceration process (presence of neutrophils), which, as previously mentioned, is due to the animal's actions and not due to the implanted material. In this animal (Table 5.2, image O), it is possible to picture a region with a bit of edema and fibrinoid necrosis. It is also associated with the ulceration process caused by the animal's behavior since the edema would be on the opposite side, and close to the polymer, there is the presence of macrophages and lymphocytes, as seen above. Furthermore, lymphocytes [yellow arrow] and bulky macrophages (epithelioid macrophages) [blue arrow] are present in greater intensity. It is also possible to identify fibroplasia, fibrosis, and neovascularization [red arrow] in greater intensity.

Twenty-one days after implantation, a discrete focally extensive lymphohistiocytic infiltrate was observed, that is, score 1 in the three groups: control (Table 5.2, images D, J, P, and V), 0.5% (v/v) (Table 5.2, images E, K, Q, and W), and 1.0% (v.v) (Table 5.2, images F, L, R, and X), characterizing a decrease in inflammatory cells present in the region surrounding and peripheral to the polymer insertion site, which suggests an involution of the inflammatory process. The cells present are macrophages [blue arrow] and lymphocytes (lymphohistiocytic infiltrate) [yellow arrow] in a smaller proportion. To a discrete degree, it is also possible to identify neovascularization and connective tissue cells (fibroblasts and fibrocytes) involving the polymer region. Neovascularization was maintained, and the presence of discrete connective tissue was detected. The provisional matrix formation around the implanted material is not an unexpected result since it is part of the reaction to a surgical process and the implantation of foreign material (Modulevsky; Cuerrier; Pelling, 2016).

Therefore, the infiltrate found in the tissues surrounding the implant was moderate after seven days of implantation, gradually decreasing to discrete at the end of 21 days, demonstrating an involution of the inflammatory process. After eliminating a danger signal, there is a decrease in the number of immune system cells to restore homeostasis and resolve an inflammatory process. In other words, a decrease in the infiltrate, so after performing their functions, the inflammatory cells leave the site injured through mechanisms such as efferocytosis (Schett; Neurath, 2018).

The growth of blood vessels and neovascularization are fundamental to physiological and pathological processes and wound healing. The blood supply needs to be adequate for

healthy cell growth and tissue formation in places near the implanted material. It also allows oxygen, immune cells, growth factors, and nutrients to reach the site (Madub et al., 2021; Ramphul et al., 2020).

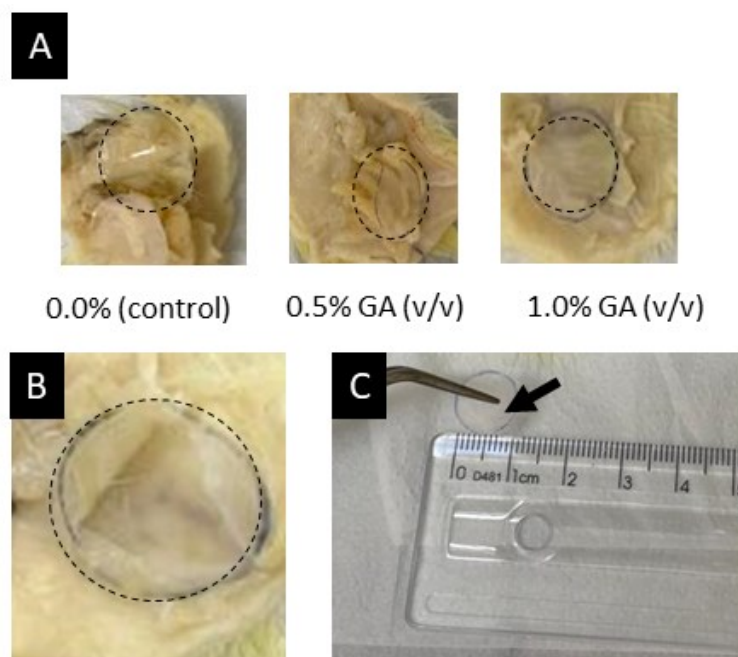
In addition to all the specific inflammatory processes, our results demonstrate the formation of a fibrous capsule around the polymer. Gsib et al. (2020) and Chagas et al. (2022) attribute the formation of thin fibrous capsules after surgical implants as a physiological defense response of the organism to the implanted foreign body. Finally, the presence of animal hair fragments in all samples is noticeable (black arrow), which were carried along with the tissues at implant removal.

Furthermore, no statistically significant differences were found between the scores of the groups that received implants of CA polymeric material incorporated with GA at concentrations of 0.5% (v/v) and 1.0% (v/v) and the negative control at 7 days after the implantation, as well as, there were no statistically significant differences between groups after 21 days (Figure 5.2). These results indicate that CA material maintained its biocompatibility characteristic when incorporated with GA even in higher concentration. This way, it was possible to obtain an antimicrobial and biocompatible material, which is promising for the biomedical purposes.

### **5.3.3 Implants characteristics after degradation**

After 21 days of surgical implantation, a sample of each polymeric implant formulation was removed from the cut tissue and the implant sites were then assessed macroscopically by measuring its diameter (dos Santos et al. 2021), Figure 5.3.

Figure 5.3 Implants removed of tissue after 21 days of implantation; (A) Implants with 0.0% (control), 0.5% and 1.0% (v/v) of GA; (B) Detail of 0.5% (v/v) implant; (C) Measure of implant.



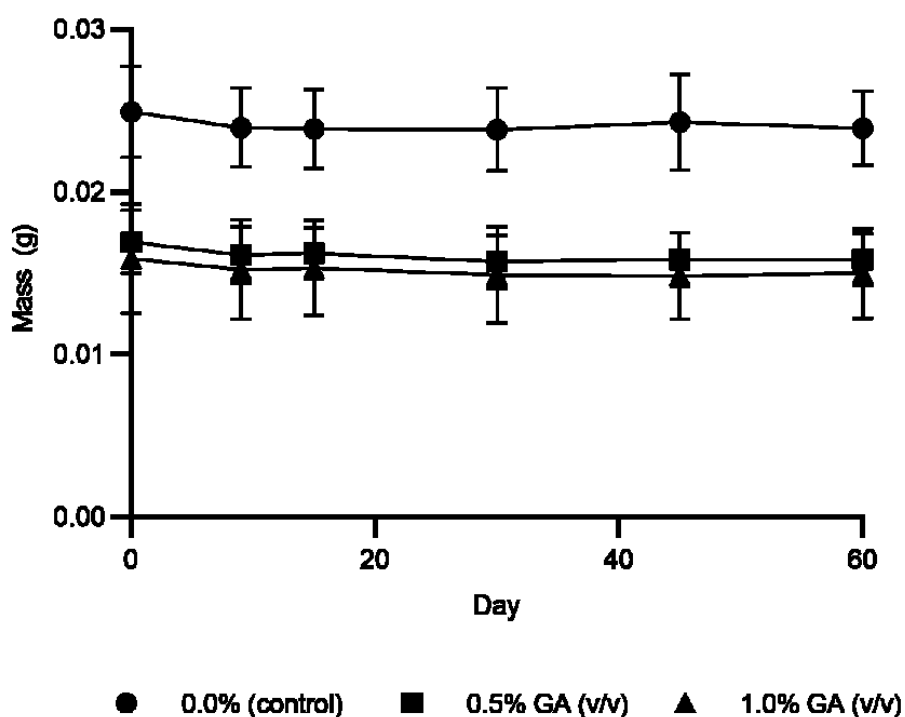
During the removal of tissue samples, all CA implants were still identified, which can be seen in Figure 5.3A and B, and seemed to be entire after 21 days of implantation with no severe signs of degradation, presenting the initial dimensions, with the same 10 mm diameter, Figure 5.3C. The highly crystalline form of cellulose is known for its resistance to active biological degradation of mammals since they do not have appropriate enzymes for the digestion of cellulose. It is noteworthy that CA is not absorbed since its degradation in the body is due to the high degree of substitution in the cellulose structure, although it is a biocompatible material (Modulevsky; Cuerrier; Pelling, 2016; Ruggiero et al., 2015).

#### 5.3.4 Degradation Test - Hydrolytic Degradation

The hydrolytic degradation occurs in aqueous medium, such as the organism of living beings. That is why the materials used to obtain biomedical devices can degrade during the period in which they remain implanted, releasing toxic components. Accordingly, degradation tests of the biomaterial under development are indispensable (International Organization for Standardization, 2010). Figure 5.4 shows the mass values determined after the hydrolytic

degradation testes during 60 days, for the sample of CA films without GA (0.0%) and with 0.5% (v/v) and 1.0% (v/v) of GA. The values found for "day zero" present the initial mass of the samples before they were immersed in PBS.

Figure 5.4 Mass of samples films on the hydrolytic degradation test.



As can be seen, the mass of the CA implant samples showed slight variation over the time they were immersed in a simulated physiological medium (PBS solution). The mass of the samples was practically constant during the 60 days. This fact was corroborated by the statistical analysis, which showed no statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) between the implant masses without the addition of GA (0.0%) through days 0, 9, 15, 30, 45, and 60. The same behavior was observed for the samples containing 0.5% (v/v) and 1.0% (v/v) of GA.

For implants with the GA-free formulation, a higher weight was found. This fact is due to the fact that during the implants acquisition, the thickness of the control samples became thicker compared to the samples containing the GA. However, this variation does not influence the result of hydrolytic degradation.

Table 5.3 shows the mass loss of polymeric cellulose acetate implants in percentage during the hydrolytic degradation test, and statistical analysis compares weight variations between days and samples.

Table 5.3 Percentage (%) of mass loss in polymeric film implants on the hydrolytic degradation test.

<b>Day</b>	<b>0.0% (control)</b>	<b>0.5% GA (v/v)</b>	<b>1.0% GA (v/v)</b>
9	3.79 ± 1.19 <sup>Aa</sup>	4.65 ± 1.14 <sup>Aa</sup>	4.06 ± 2.96 <sup>Aa</sup>
15	4.09 ± 1.07 <sup>Aa</sup>	3.97 ± 2.29 <sup>Aa</sup>	3.27 ± 3.68 <sup>Aa</sup>
30	4.37 ± 0.64 <sup>Aa</sup>	6.99 ± 1.35 <sup>Aa</sup>	6.13 ± 2.52 <sup>Aa</sup>
45	2.59 ± 1.45 <sup>Aa</sup>	6.21 ± 1.32 <sup>Aa</sup>	6.07 ± 3.05 <sup>Aa</sup>
60	3.88 ± 1.78 <sup>Aa</sup>	6.18 ± 2.18 <sup>Aa</sup>	5.30 ± 3.93 <sup>Aa</sup>

Equal lowercase letters represent no significant differences between rows, and equal uppercase letters represent no significant differences between columns ( $p < 0.05$ ).

Data in Table 5.3 corroborates what was already discussed above because when the percentage of variation in implant mass is evaluated compared to the initial weight, it is possible to verify that it does not change from the beginning to the end of the analysis. In other words, there is a constant and statistically equal variation between days 9, 15, 30, 45, and 60 for all formulations. This variation is slight and can be explained by random phenomena inherent to the measurement process - not characterizing the sample degradation in the physiological medium simulated.

Furthermore, it is possible to argue that the percentage of variation in the mass of the samples on each of the weighing days does not present a statistically significant difference between the implant formulations, regardless of whether it had GA in the formulation. This information is of great value, as it is inferred that the addition of the antimicrobial agent to the implant does not affect its degradation when inserted in a simulated physiological environment which corroborates with the macroscopic identification of the implants after 21 days.

Sofi et al. (2021) formulated multifunctional CA nanofiber containing hydroxyapatite (HAp) as nucleating agents and silver (Ag) nanoparticles (NPs) to form a biomaterial with antibacterial action. When the weight loss was evaluated in pure PBS, the authors reported that the presence of HAp and Ag NPs increased degradation rates because these compounds lowered the fiber density. As a result, it becomes easily susceptible to degradation, presenting about

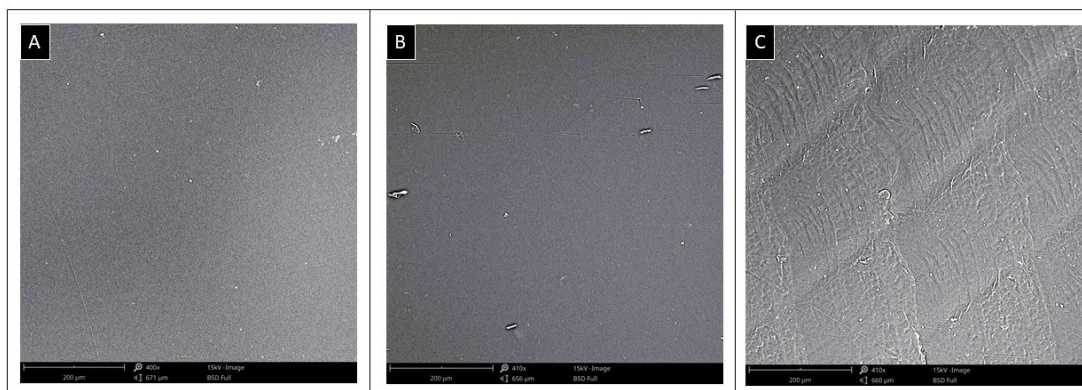
18.6% of the weight loss after 60 days of tests, compared to the only 6.1% in the material with pure CA - being this low value very similar to that obtained for all samples in this degradation study.

Kang and Fang (2018) state that when the material of implants is degraded, some sensitivity reactions may arise in the human body. In the present study, no signs of local edema or inflammation that could cause sensitivity reactions in rats were observed, which agrees with the non-statistical significance of the data regarding hydrolytic degradation, regardless of the presence or not of GA in the implant formulation.

### 5.3.5 Surface morphology of the CA films

To evaluate the presence of degradation signs on the surface of the implants after 60 days of immersion in PBS, the surfaces of the samples were analyzed using a scanning electron microscope (SEM), Figure 5.5.

Figure 5.5 SEM micrographs obtained for surface of the samples submitted to the degradation test after 60 days of immersion in the PBS solution. (A) CA Implants without GA (control), (B) CA with 0.5% (v/v) of GA and (C) CA with 1.0% (v/v) of GA.



As can be seen in Figure 5.5, there were no evident signs of degradation for CA films both with and without the GA, which corroborates with the results found in the hydrolytic degradation tests. These results are in agreement with those reported by other studies that also evaluated the degradation of CA materials in PBS solution (Santos et al., 2021; Sofi et al., 2021; Tsiapla et al., 2018), which related that this material has low water solubility and is a slowly degradable biomaterial.

Additionally, it seems that the incorporation of GA in the polymeric matrix made the surface less uniform, being that this feature was more evident in the implant with 1.0% of GA. This behavior may be due to the removed of the GA that was in the surface of the CA matrix, highlighting the importance of GA release study.

### 5.3.6 Geranyl Acetate Release

The *in vitro* GA release was carried out in PBS, pH (~7.4), at 37 °C. After 60 days of the polymeric implant samples immersion in PBS, the material was removed from the solution, and the absorbance was measured to determine the GA concentration released from the implants. The results are shown in Table 5.4.

Table 5.4 Results for the amount of GA released of CA polymeric films after 60 days.

GA concentration in implant	GA concentration in solution (mg/mL)
0.5% GA (v/v)	<0.5
1.0% GA (v/v)	<0.5

According to Table 5.4, none of the implant samples released GA in a higher concentration than 0.5 mg/mL for the biological media during 60 days. Even that the SEM micrograph suggested a surface modification to films with 1.0% (v/v) of GA, Figure 5.5c, which could be attributed to the GA leaving the CA matrix, according to the release study if some GA migrated from the polymer matrix, it was in a concentration lower than 0.5 mg/mL. This amount is not enough to cause toxicity to alive systems (Zeferino, 2022), so, biocompatibility of CA films with GA would not be damaged.

In this sense, the incorporation of GA for promoting the antibacterial activity for CA implants did not change the degradation rates of the biomaterial developed by us, which is a promising result, given that there is still a need for non-resorbable, yet inert and biocompatible, scaffolds persisting in the field of tissue and organ engineering (Modulevsky; Cuerrier; Pelling, 2016).



Still, considering that GA is the antimicrobial agent, we may assume that the antimicrobial activity of the biomaterial remains in the CA implants, which is particularly interesting because these implants will be protected from microbial pathogenic agents for a longer time. However, more detailed studies are necessary to verify this claim, being that approached in a future study.

#### 5.4 CONCLUSION

The antimicrobial CA implants were obtained by incorporating GA in two different concentrations through the casting method. In conclusion, our study demonstrates that the GA did not cause any unnatural reaction to the animal's tissue, suggesting that the biocompatibility of CA biomaterial was maintained even with the presence of an antimicrobial agent, as the *in vivo* experiments indicated.

Even after 21 days of surgical procedure, it was possible to identify the CA implants in animals' tissue, which indicates that this biomaterial was not significantly degraded. This result could be confirmed by the *in vitro* degradation test and by SEM, which demonstrated that CA material did not present a high weight loss rate during 60 days immersed in PBS solution. GA also did not influence the degradation of the material because there were no statistical discrepancies between the weight loss of samples with and without the antimicrobial agent.

According to the GA release study, if the antimicrobial agent was released from the polymeric matrix, it was happening in a meager amount ( $<0.5$  mg/mL), which leads us to believe that the antimicrobial activity of CA material remains over time, ensuring the biosecurity.

These results indicate that it is possible to have a biocompatible and antimicrobial polymer of CA when incorporated with GA, which is very serviceable for biomedical applications.

#### **Acknowledgments**

We thank Laboratory of Technology and Mechanical Characterization from Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI) - Joinville (Brazil) for SEM images. We also thank Laboratório de Materiais Multifuncionais (LMF) and Laboratório de Tecnologia e Processos



de Materiais (LaTEM) from Unochapecó – Chapecó (Brazil) for the structure to accomplish this work. Finally, the authors are especially grateful to Centro de Bioterismo (Unochapecó) for technical assistance with animals and Volta Grande Laboratory – Chapecó (Brazil) for the reports' histopathological analysis and technical support.

## References

- Agarwal, K. M., Singh, P., Mohan, U., Mandal, S., & Bhatia, D. (2020). Comprehensive study related to advancement in biomaterials for medical applications. *Sensors International, 1*, 100055. <https://doi.org/10.1016/J.SINTL.2020.100055>
- Al-Saeedi, S. I., Al-Kadhi, N. S., Al-Senani, G. M., Almaghrabi, O. A., & Nafady, A. (2021). Antibacterial potency, cell viability and morphological implications of copper oxide nanoparticles encapsulated into cellulose acetate nanofibrous scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules, 182*, 464–471. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.04.013>
- Aly, A. A., & Ahmed, M. K. (2021). Nanofibers of cellulose acetate containing ZnO nanoparticles/graphene oxide for wound healing applications. *International Journal of Pharmaceutics, 598*, 120325. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2021.120325>
- Asadi, N., Del Bakhshayesh, A. R., Davaran, S., & Akbarzadeh, A. (2020). Common biocompatible polymeric materials for tissue engineering and regenerative medicine. *Materials Chemistry and Physics, 242*, 122528. <https://doi.org/10.1016/J.MATCHEMPHYS.2019.122528>
- Athira, V. B., Mohanty, S., & Nayak, S. K. (2020). Preparation and characterization of porous polyethersulfone (PES) membranes with improved biocompatibility by blending sulfonated polyethersulfone (SPES) and cellulose acetate (CA) – A comparative study. *Materials Today Communications, 25*, 101544. <https://doi.org/10.1016/J.MTCOMM.2020.101544>

- Augustine, R., & Hasan, A. (2020). Emerging applications of biocompatible phytosynthesized metal/metal oxide nanoparticles in healthcare. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 56, 101516. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2020.101516>
- Axinte, D., Guo, Y., Liao, Z., Shih, A. J., M'Saoubi, R., & Sugita, N. (2019). Machining biocompatible materials — Recent advances. *CIRP Annals*.  
<https://doi.org/10.1016/j.cirp.2019.05.003>
- Azhar, O., Jahan, Z., Sher, F., Niazi, M. B. K., Kakar, S. J., & Shahid, M. (2021). Cellulose acetate-polyvinyl alcohol blend hemodialysis membranes integrated with dialysis performance and high biocompatibility. *Materials Science and Engineering: C*, 126, 112127. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2021.112127>
- Boothby, I. C., Cohen, J. N., & Rosenblum, M. D. (2020). Regulatory T cells in skin injury: At the crossroads of tolerance and tissue repair. In *Science Immunology* (Vol. 5, Issue 47). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaz9631>
- Boye, C., Christensen, K., Asadipour, K., DeClemente, S., Francis, M., & Bulysheva, A. (2022). Gene electrotransfer of FGF2 enhances collagen scaffold biocompatibility. *Bioelectrochemistry*, 144, 107980.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIOELECTHEM.2021.107980>
- Caetano, G. F. Biomembrana de quitosana-alginato na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos. 2012. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2012.
- Carvalho, D. de M., Takeuchi, K. P., Geraldine, R. M., Moura, C. J. de, & Silveira, M. F. A. (2017). Filme ativo de acetato de celulose incorporado com nanosuspensão de curcumina. *Polímeros*, 27(spe), 70–76. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.2232>
- Castillo-Ortega, M. M., Nájera-Luna, A., Rodríguez-Félix, D. E., Encinas, J. C., Rodríguez-Félix, F., Romero, J., & Herrera-Franco, P. J. (2011). Preparation, characterization and release of amoxicillin from cellulose acetate and poly(vinyl pyrrolidone) coaxial

electrospun fibrous membranes. *Materials Science and Engineering: C*, 31(8), 1772–1778. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2011.08.009>

Celuppi, L. C. M., Capelezzo, A. P., Cima, L. B., Zeferino, R. C. F., Zanetti, M., Riella, H. G., & Fiori, M. A. (2022). Antimicrobial cellulose acetate films by incorporation of geranyl acetate for active food packaging application. *Research, Society and Development*, 11(1), e40111125141. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i1.25141>

Chainoglou, E., Karagkiozaki, V., Choli-Papadopoulou, T., Mavromanolis, C., Laskarakis, A., & Logothetidis, S. (2016). Development of Biofunctionalized Cellulose Acetate Nanoscaffolds for Heart Valve Tissue Engineering. *World Journal of Nano Science and Engineering*, 06(04). <https://doi.org/10.4236/wjnse.2016.64013>

Das, S., Singh, V. K., Dwivedy, A. K., Chaudhari, A. K., Upadhyay, N., Singh, A., Deepika, & Dubey, N. K. (2019). Antimicrobial activity, antiaflatoxigenic potential and in situ efficacy of novel formulation comprising of *Apium graveolens* essential oil and its major component. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 160, 102–111. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2019.07.013>

De Lima Das Chagas, A., Paula De Oliveira, L., Cruz, M. V., Miranda De Melo, R., Pacheco Miguel, M., Fernandes, K. F., & Borges De Menezes, L. (2022). *Polysaccharide-Based Membrane Biocompatibility Study of Anacardium occidentale L. and Polyvinyl Alcohol after Subcutaneous Implant in Rats*. <https://doi.org/10.3390/ma15041296>

Djihane, B., Wafa, N., Elkhamssa, S., Pedro, D. H. J., Maria, A. E., & Mohamed Mihoub, Z. (2017). Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(5), 780–787. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.11.001>

- dos Santos, A. E. A., dos Santos, F. V., Freitas, K. M., Pimenta, L. P. S., de Oliveira Andrade, L., Marinho, T. A., de Avelar, G. F., da Silva, A. B., & Ferreira, R. V. (2021). Cellulose acetate nanofibers loaded with crude annatto extract: Preparation, characterization, and in vivo evaluation for potential wound healing applications. *Materials Science and Engineering: C*, *118*, 111322. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2020.111322>
- Esmaeili, E., Eslami-Arshaghi, T., Hosseinzadeh, S., Elahirad, E., Jamalpoor, Z., Hatamie, S., & Soleimani, M. (2020). The biomedical potential of cellulose acetate/polyurethane nanofibrous mats containing reduced graphene oxide/silver nanocomposites and curcumin: Antimicrobial performance and cutaneous wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, *152*, 418–427. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.02.295>
- Faria, J., Dionísio, B., Soares, Í., Baptista, A. C., Marques, A., Gonçalves, L., Bettencourt, A., Baleizão, C., & Ferreira, I. (2022). Cellulose acetate fibres loaded with daptomycin for metal implant coatings. *Carbohydrate Polymers*, *276*, 118733. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118733>
- Federal University of São Paulo. Guia anestesia e analgesia em animais de laboratório. São Paulo, 2017.
- Figueiredo, A., Coimbra, P., Cabrita, A., Guerra, F., & Figueiredo, M. (2013). Comparison of a xenogeneic and an alloplastic material used in dental implants in terms of physico-chemical characteristics and in vivo inflammatory response. *Materials Science and Engineering C*, *33*(6). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.04.047>
- Flaig, I., Radenković, M., Najman, S., Pröhl, A., Jung, O., & Barbeck, M. (2020). In vivo analysis of the biocompatibility and immune response of jellyfish collagen scaffolds and its suitability for bone regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(12). <https://doi.org/10.3390/ijms21124518>

- França, D. C. C., de Castro, A. L., Soubhia, A. M. P., de Aguiar, S. M. H. C. Á., & Goiato, M. C. (2013). Evaluation of the biocompatibility of silicone gel implants - histomorphometric study. *Acta Informatica Medica*, 21(2).  
<https://doi.org/10.5455/aim.2013.21.93-97>
- Gomaa, S. F., Madkour, T. M., Moghannem, S., & El-Sherbiny, I. M. (2017). New polylactic acid/ cellulose acetate-based antimicrobial interactive single dose nanofibrous wound dressing mats. *International Journal of Biological Macromolecules*.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.145>
- Gouma, P., Xue, R., Goldbeck, C. P., Perrotta, P., & Balázs, C. (2012). Nano-hydroxyapatite - Cellulose acetate composites for growing of bone cells. *Materials Science and Engineering C*, 32(3), 607–612. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.12.019>
- Gouvêa, D. M., Mendonça, R. C. S., Soto, M. L., & Cruz, R. S. (2015). Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 85–91. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.03.014>
- Gsib, O., Eggermont, L. J., Egles, C., & Bencherif, S. A. (2020). Engineering a macroporous fibrin-based sequential interpenetrating polymer network for dermal tissue engineering. *Biomaterials Science*, 8(24). <https://doi.org/10.1039/d0bm01161d>
- Ioniță, M., Crică, L. E., Voicu, S. I., Dinescu, S., Miculescu, F., Costache, M., & Iovu, H. (2018). Synergistic effect of carbon nanotubes and graphene for high performance cellulose acetate membranes in biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 183. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.095>
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO 10993-13:2010 Biological valuation of medical devices - Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO 10993-6:2007 Biological evaluation of medical devices — Part 6: Tests for local effects after implantation.

Jones, H. R., Robb, C. T., Perretti, M., & Rossi, A. G. (2016). The role of neutrophils in inflammation resolution. In *Seminars in Immunology* (Vol. 28, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.007>

Junqueira, I. C. U.; Carneiro, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524 p.

Jurak, M., Wiącek, A. E., Ładniak, A., Przykaza, K., & Szafran, K. (2021). What affects the biocompatibility of polymers? In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 294). <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102451>

Kang, C. W., & Fang, F. Z. (2018). State of the art of bioimplants manufacturing: part I. *Advances in Manufacturing*, 6(1). <https://doi.org/10.1007/s40436-017-0207-4>

Kee, C. M., & Idris, A. (2010). Permeability performance of different molecular weight cellulose acetate hemodialysis membrane. *Separation and Purification Technology*, 75(2), 102–113. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2010.08.013>

Koo, S. Jie, & Garg, N. J. (2019). Metabolic programming of macrophage functions and pathogens control. *Redox Biology*, 24, 101198. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2019.101198>

Lapomarda, A., De Acutis, A., Chiesa, I., Fortunato, G. M., Montemurro, F., De Maria, C., Mattioli Belmonte, M., Gottardi, R., & Vozzi, G. (2020). Pectin-GPTMS-Based Biomaterial: Toward a Sustainable Bioprinting of 3D scaffolds for Tissue Engineering Application. *Biomacromolecules*, 21(2). <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01332>

- Lapomarda, A., Cerqueni, G., Geven, M. A., Chiesa, I., De Acutis, A., De Blasi, M., Montemurro, F., De Maria, C., Mattioli-Belmonte, M., & Vozzi, G. (2021). Physicochemical Characterization of Pectin-Gelatin Biomaterial Formulations for 3D Bioprinting. *Macromolecular Bioscience*, *21*(9). <https://doi.org/10.1002/mabi.202100168>
- Lee, J., Moon, J. Y., Lee, J. C., Hwang, T. I., Park, C. H., & Kim, C. S. (2021). Simple conversion of 3D electrospun nanofibrous cellulose acetate into a mechanically robust nanocomposite cellulose/calcium scaffold. *Carbohydrate Polymers*, *253*, 117191. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.117191>
- Lei, L., Huang, W., Liu, K., Liu, X., Dai, M., Liu, Z., & Zhiao, Y. (2022). Trilazad mesylate-loaded electrospun cellulose acetate nanofibrous wound dressings promote diabetic wound healing by modulation of immune response and protection against oxidative damage. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *69*, 102863. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2021.102863>
- Liakos, I. L., Iordache, F., Carzino, R., Scarpellini, A., Oneto, M., Bianchini, P., Grumezescu, A. M., & Holban, A. M. (2018). Cellulose acetate - essential oil nanocapsules with antimicrobial activity for biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *172*, 471–479. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2018.08.069>
- Liang, Y., Liang, Y., Zhang, H., & Guo, B. (2022). Antibacterial biomaterials for skin wound dressing. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/J.AJPS.2022.01.001>
- Liao, N., Unnithan, A. R., Joshi, M. K., Tiwari, A. P., Hong, S. T., Park, C. H., & Kim, C. S. (2015). Electrospun bioactive poly( $\epsilon$ -caprolactone)-cellulose acetate-dextran antibacterial composite mats for wound dressing applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *469*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.01.022>
- Luna, L. G. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. New York: McGraw-Hill, 13 ed., 258p.,1968.

- Madub, K., Goonoo, N., Gimié, F., Ait Arsa, I., Schönherr, H., & Bhaw-Luximon, A. (2021). Green seaweeds ulvan-cellulose scaffolds enhance in vitro cell growth and in vivo angiogenesis for skin tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 251. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117025>
- Machałowski, T., Idaszek, J., Chlanda, A., Heljak, M., Piasecki, A., Świąszkowski, W., & Jesionowski, T. (2022). Naturally prefabricated 3D chitinous skeletal scaffold of marine demosponge origin, biomineralized ex vivo as a functional biomaterial. *Carbohydrate Polymers*, 275. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118750>
- Mianehro, A. (2022). Electrospun Bioscaffold Based on Cellulose Acetate and Dendrimer-modified Cellulose Nanocrystals for Controlled Drug Release. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 3, 100187. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100187>
- Milovanovic, S., Markovic, D., Aksentijevic, K., Stojanovic, D. B., Ivanovic, J., & Zizovic, I. (2016). Application of cellulose acetate for controlled release of thymol. *Carbohydrate Polymers*, 147, 344–353. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.03.093>
- Minutti, C. M., Knipper, J. A., Allen, J. E., & Zaiss, D. M. W. (2017). Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 61). <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.006>
- Modulevsky, D. J., Cuerrier, C. M., & Pelling, A. E. (2016). Biocompatibility of Subcutaneously Implanted Plant-Derived Cellulose Biomaterials. *PLoS ONE*, 11(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157894>
- National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). Resolução Normativa no 37: Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA. Brasília, 2018.
- Nosar, M. N., Salehi, M., Ghorbani, S., Beiranvand, S. P., Goodarzi, A., & Azami, M. (2016). Characterization of wet-electrospun cellulose acetate based 3-dimensional scaffolds for



skin tissue engineering applications: influence of cellulose acetate concentration. *Cellulose*, 23(5). <https://doi.org/10.1007/s10570-016-1026-7>

- Pandele, A. M., Comanici, F. E., Carp, C. A., Miculescu, F., Voicu, S. I., Thakur, V. K., & Serban, B. C. (2017). Synthesis and characterization of cellulose acetate-hydroxyapatite micro and nano composites membranes for water purification and biomedical applications. *Vacuum*, 146, 599–605. <https://doi.org/10.1016/J.VACUUM.2017.05.008>
- Pandele, A. M., Neacsu, P., Cimpean, A., Staras, A. I., Miculescu, F., Iordache, A., Voicu, S. I., Thakur, V. K., & Toader, O. D. (2018). Cellulose acetate membranes functionalized with resveratrol by covalent immobilization for improved osseointegration. *Applied Surface Science*, 438, 2–13. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2017.11.102>
- Peiseler, M., & Kubes, P. (2019). More friend than foe: The emerging role of neutrophils in tissue repair. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 129, Issue 7). <https://doi.org/10.1172/JCI124616>
- Pereira, N. R. L., Lopes, B., Fagundes, I. V., de Moraes, F. M., Morisso, F. D. P., Parma, G. O. C., Zepon, K. M., & Magnago, R. F. (2022). Bio-packaging based on cellulose acetate from banana pseudostem and containing *Butia catarinensis* extracts. *International Journal of Biological Macromolecules*, 194, 32–41. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.11.179>
- Ramphul, H., Gimié, F., Andries, J., Jhurry, D., & Bhaw-Luximon, A. (2020). Sugar-cane bagasse cellulose-based scaffolds promote multi-cellular interactions, angiogenesis and reduce inflammation for skin tissue regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.176>
- Rodrigues Filho, G., Almeida, F., Ribeiro, S. D., Tormin, T. F., Muñoz, R. A. A., Assunção, R. M. N., & Barud, H. (2016). Controlled release of drugs from cellulose acetate matrices produced from sugarcane bagasse: monitoring by square-wave voltammetry.

*Drug Development and Industrial Pharmacy*, 42(7).

<https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1107093>

Ruggiero, R., de Almeida Carvalho, V., da Silva, L. G., de Magalhães, D., Ferreira, J. A., de Menezes, H. H. M., de Melo, P. G., & Naves, M. M. (2015). Study of in vitro degradation of cellulose acetate membranes modified and incorporated with tetracycline for use as an adjuvant in periodontal reconstitution. *Industrial Crops and Products*, 72, 2–6. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.03.021>

Schett, G., & Neurath, M. F. (2018). Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. In *Nature Communications* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05800-6>

Schuster, R., Rockel, J. S., Kapoor, M., & Hinz, B. (2021). The inflammatory speech of fibroblasts. In *Immunological Reviews* (Vol. 302, Issue 1). <https://doi.org/10.1111/imr.12971>

Sharaf, S. M., Al-Mofty, S. E. D., El-Sayed, E. S. M., Omar, A., Abo Dena, A. S., & El-Sherbiny, I. M. (2021). Deacetylated cellulose acetate nanofibrous dressing loaded with chitosan/propolis nanoparticles for the effective treatment of burn wounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 2029–2037. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.11.034>

Sheridan, M., Winters, C., Zamboni, F., & Collins, M. N. (2022). Biomaterials: Antimicrobial surfaces in biomedical engineering and healthcare. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 22, 100373. <https://doi.org/10.1016/J.COBME.2022.100373>

Sofi, H. S., Akram, T., Shabir, N., Vasita, R., Jadhav, A. H., & Sheikh, F. A. (2021). Regenerated cellulose nanofibers from cellulose acetate: Incorporating hydroxyapatite (HAp) and silver (Ag) nanoparticles (NPs), as a scaffold for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering C*, 118. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111547>

- Song, J., Winkeljann, B., & Lieleg, O. (2020). Biopolymer-Based Coatings: Promising Strategies to Improve the Biocompatibility and Functionality of Materials Used in Biomedical Engineering. In *Advanced Materials Interfaces* (Vol. 7, Issue 17). <https://doi.org/10.1002/admi.202000850>
- Thanka Rajan, S., Subramanian, B., & Arockiarajan, A. (2022). A comprehensive review on biocompatible thin films for biomedical application. *Ceramics International*, *48*(4), 4377–4400. <https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2021.10.243>
- Tsiapla, A. R., Karagkiozaki, V., Bakola, V., Pappa, F., Gkertsiou, P., Pavlidou, E., & Logothetidis, S. (2018). Biomimetic and biodegradable cellulose acetate scaffolds loaded with dexamethasone for bone implants. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *9*(1). <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.189>
- Ullah, A., Saito, Y., Ullah, S., Haider, M. K., Nawaz, H., Duy-Nam, P., Kharaghani, D., & Kim, I. S. (2021). Bioactive Sambong oil-loaded electrospun cellulose acetate nanofibers: Preparation, characterization, and in-vitro biocompatibility. *International Journal of Biological Macromolecules*, *166*, 1009–1021. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.10.257>
- Ullah, A., Ullah, S., Khan, M. Q., Hashmi, M., Nam, P. D., Kato, Y., Tamada, Y., & Kim, I. S. (2020). Manuka honey incorporated cellulose acetate nanofibrous mats: Fabrication and in vitro evaluation as a potential wound dressing. *International Journal of Biological Macromolecules*, *155*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.237>
- Umar, M., Khan, A., Izwan, S., Razak, A., Shamsan, W., Arjan, A., Nazir, S., Joseph, T., Anand, S., Mehboob, H., & Amin, R. (2021). molecules Recent Advances in Biopolymeric Composite Materials for Tissue Engineering and Regenerative Medicines: A Review. *Hang Tuah Jaya*, *76100*. <https://doi.org/10.3390/molecules26030619>
- Vatankhah, E., Prabhakaran, M. P., Jin, G., Mobarakeh, L. G., & Ramakrishna, S. (2014). Development of nanofibrous cellulose acetate/gelatin skin substitutes for variety wound

- treatment applications. *Journal of Biomaterials Applications*, 28(6), 909–921.  
<https://doi.org/10.1177/0885328213486527>
- Voicu, S. I., Condruz, R. M., Mitran, V., Cimpean, A., Miculescu, F., Andronescu, C., Miculescu, M., & Thakur, V. K. (2016). Sericin Covalent Immobilization onto Cellulose Acetate Membrane for Biomedical Applications. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4(3). <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01756>
- Wsoo, M. A., Shahir, S., Mohd Bohari, S. P., Nayan, N. H. M., & Razak, S. I. A. (2020). A review on the properties of electrospun cellulose acetate and its application in drug delivery systems: A new perspective. In *Carbohydrate Research* (Vol. 491).  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.107978>
- Wu, Y., Ruan, Q., Huang, C., Liao, Q., Liu, L., Liu, P., Mo, S., Wang, G., Wang, H., & Chu, P. K. (2022). Balancing the biocompatibility and bacterial resistance of polypyrrole by optimized silver incorporation. *Materials Science and Engineering: C*, 112701.  
<https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2022.112701>
- Xie, J., & Hung, Y. C. (2019). Methodology to evaluate the antimicrobial effectiveness of UV-activated TiO<sub>2</sub> nanoparticle-embedded cellulose acetate film. *Food Control*, 106, 106690. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2019.06.016>
- Yi, F., Sun, J., Bao, X., Ma, B., & Sun, M. (2019). Influence of molecular distillation on antioxidant and antimicrobial activities of rose essential oils. *LWT*, 102.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.051>
- Zeferino, Rubieli Carla Frezza. Síntese de Acetato de Geranila e Acetato de Nerila Via Catálise Heterogênea com Resina de Troca Iônica e Caracterização dos Ésteres para Potenciais Aplicações como Aditivos Antimicrobianos. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química, Florianópolis, 2021, 202p. Disponível em:  
<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/231154/PENQ0922-T.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>. Acesso em: 12/03/2022.

## CAPÍTULO 6

### PRINCIPAIS RESULTADOS

Os resultados desta tese foram apresentados na forma de três artigos científicos segmentados, portanto, neste capítulo encontram-se destacados os aspectos mais relevantes dos trabalhos desenvolvidos.

Com o objetivo de se obter filmes antimicrobianos, duas concentrações do éster acetato de geranila foram incorporadas nos filmes poliméricos de acetato de celulose pelo método de *casting*, sendo estas 0,5% (v/v) e 1,0% (v/v). Os procedimentos metodológicos, resultados e discussões utilizados para validar esta proposta de tese foram publicados no artigo apresentado no Capítulo 3.

A avaliação da propriedade antibacteriana foi realizada por meio da análise de contagem de microrganismos sobreviventes ao longo do tempo (curva de morte) para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para o filme contendo 0,5% (v/v) de acetato de geranila, quando analisada a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*, após 1 hora de inoculação já não existiam mais bactérias sobreviventes na superfície do filme. A completa inibição do crescimento microbiano ocorreu em um curto tempo de exposição, mesmo considerando a menor concentração de acetato de geranila. Para a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, após uma hora de exposição ainda haviam células sobreviventes na superfície do material, entretanto, após 2 horas foi verificada a completa inativação do crescimento desta bactéria. O filme sem a incorporação de acetato de geranila apresentou contagem microbiana elevada nestes tempos, o que permitiu inferir que o filme de acetato de celulose produzido com o agente antimicrobiano acetato de geranila manifestou a capacidade de inibir a proliferação bacteriana na sua superfície.

A análise antibacteriana dos filmes também foi atestada por meio da técnica de difusão em ágar, considerando os mesmos microrganismos supracitados. Para o filme de acetato de celulose puro não foi detectado halo de inibição, ou seja, não há atividade antimicrobiana neste filme. Porém, para a bactéria *Staphylococcus aureus* foram formados halos de inibição tanto para o filme contendo 0,5% (v/v) de acetato de geranila quanto para o filme com 1,0% (v/v) de acetato de geranila, com diâmetros médios dos halos de inibição de  $17,7 \pm 0,6$  mm e  $27,3 \pm 0,6$  mm, respectivamente. Para a bactéria *Escherichia coli* não foram observados halos de inibição para nenhuma das concentrações de acetato de geranila nos filmes de acetato de celulose.

Ambos os estudos antibacterianos atestaram que os filmes contendo acetato de geranila apresentam atividade antibacteriana significativa. Os resultados indicam fortes evidências de que o acetato de geranila está presente na superfície dos filmes de acetato de celulose em quantidade suficiente para inibir o crescimento de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e de bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*), na concentração de  $10^4$  UFC.

Os resultados dos testes antifúngicos dos filmes antimicrobianos foram apresentados e discutidos no Capítulo 3 e Capítulo 4 (artigo 1 e artigo 2, respectivamente), sendo que para ambos os fungos estudados (*Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*) o comportamento foi semelhante. O filme contendo 0,5% (v/v) de acetato de geranila reduziu o crescimento dos fungos em comparação com os filmes de acetato de celulose sem o agente antimicrobiano. Com a incorporação de 1,0% (v/v) de acetato de geranila, o crescimento de ambos os fungos na superfície dos filmes foi praticamente nulo, comprovando a atividade antifúngica para os filmes antimicrobianos desenvolvidos.

A partir dos resultados antimicrobianos foi possível inferir que o acetato de geranila foi incorporado nos filmes de acetato de celulose e com eficiência agregou ao material as propriedades antibacteriana e antifúngica. Estes resultados motivam futuras aplicações para o acetato de celulose antimicrobiano na produção de embalagens ativas e de produtos para a área biomédica.

Embora o acetato de celulose e o acetato de geranila possuam grupos funcionais semelhantes em sua estrutura química, com a análise de FTIR foi possível observar indicativos de que o acetato de geranila foi incorporado aos filmes de acetato de celulose, devido a avaliação da banda associada ao grupo OH, o qual só está presente no acetato de celulose e não no acetato de geranila. Ainda, não foram encontradas evidências de ligações químicas entre o acetato de celulose e o acetato de geranila. Esta inferência foi corroborada pela análise de DSC, onde os filmes apresentaram, tanto no primeiro resfriamento quanto no segundo aquecimento, uma temperatura de transição vítrea bem definida. As propriedades térmicas do filme não foram alteradas significativamente, segundo as análises térmicas (TGA e DSC).

Ainda considerando os resultados obtidos pela técnica de TGA, foi possível afirmar que os termogramas obtidos estão de acordo com aqueles relatados na literatura para o acetato de celulose. A partir dos termogramas dos filmes antimicrobianos, foi possível constatar a presença de 2,4% e 3,7%, em massa, de acetato de geranila nos filmes contendo 0,5 (v/v%) e 1,0 (v/v)% do éster, respectivamente. Ainda nestes termogramas foi observado um evento

térmico adicional, em temperaturas superiores, sendo que este evento possivelmente está associado à degradação do acetato de geranila residual, que estava incorporado no volume do filme de acetato de celulose. Esta quantidade de acetato de geranila ficou protegida termicamente pela matriz de acetato de celulose, tendo a sua degradação apenas após a degradação da matriz polimérica, verificada em temperaturas acima de 380 °C. Com a degradação térmica da matriz polimérica, o acetato de geranila até então protegido, é liberado.

Essa importante constatação corrobora com os resultados antimicrobianos, os quais indicam a presença de éster em quantidade suficiente para gerar zonas de inibição para *Staphylococcus aureus* e inibir o crescimento microbiano de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* na superfície dos filmes.

As propriedades mecânicas sob esforço de tração dos filmes de acetato de celulose não foram modificadas significativamente pela incorporação do acetato de geranila e, mesmo que os filmes tenham apresentado resultados de dispersão os quais implicam na heterogeneidade das propriedades mecânicas, foi possível constatar que os valores médios para o módulo de elasticidade e para a resistência à tração são similares aos valores relatados pela literatura científica para o acetato de celulose. Estes resultados são de grande valia e motivam futuros trabalhos investigativos mais detalhados para o comportamento mecânico dos filmes antimicrobianos desenvolvidos. Porém, embora preliminares, os resultados mecânicos obtidos no presente estudo são fortes indicadores de que a incorporação do acetato de geranila poderá ser realizada sem causar prejuízos as propriedades mecânicas dos filmes de acetato de celulose.

A última etapa do trabalho consistiu em testes específicos para atestar a biocompatibilidade dos filmes de acetato de celulose antimicrobianos, desenvolvidos com vistas às atividades antibacteriana e antifúngica. Estes testes foram realizados *in vivo*, baseados na norma ISO 10993. Os *scaffolds* (implantes poliméricos) foram implantados subcutaneamente em Ratos Wistar imunocompetentes, e após 7 e 21 dias foram realizadas análises histológicas do tecido circundante ao implante. Os resultados demonstraram que os filmes de acetato de celulose antimicrobianos não causaram danos/reação tecidual atípica aos animais, sendo que na coleta histológica de 7 dias foi encontrado um infiltrado classificado como “intermediário”, com a presença de várias células e componentes inflamatórios. Esse processo era esperado, uma vez que um corpo estranho foi inserido no animal. Entretanto, o infiltrado encontrado nos tecidos ao redor do implante foi diminuindo gradativamente, sendo classificado como “discreto” ao final de 21 dias, demonstrando uma involução do processo

inflamatório e a aceitação do implante pelos animais. Esse comportamento foi comum para todos os filmes, inclusive àqueles com acetato de geranila, o que indica que a incorporação do agente antimicrobiano não afetou a característica biocompatível inerente ao acetato de celulose.

Também foram realizados ensaios *in vitro*, como o teste de degradação hidrolítica, os quais demonstraram que os filmes de acetato de celulose não apresentaram perdas significativas de massa durante os 60 dias de imersão em um meio fisiológico simulado (PBS), sendo o baixo percentual de perda de massa igual para todos os filmes. Ou seja, a adição do acetato de geranila não interfere nas taxas de degradação do acetato de celulose, que apresentou um comportamento semelhante ao descrito na literatura científica. A baixa taxa de degradação do acetato de celulose é relatada na literatura, e foi corroborada com o teste *in vitro* de degradação hidrolítica e também com a medição dos *scaffolds* após 21 dias de implantação, sendo que os mesmos mantiveram as dimensões iniciais.

Quando analisadas a superfície dos filmes imersos em PBS após 60 dias de análise, não foram detectados, para nenhuma das amostras, sinais de defeitos na superfície, o que seria um indício característico do processo degradativo da matriz polimérica, caso este estivesse ocorrendo. Tal fato que corrobora com a análise de degradação hidrolítica, reforçando a ideia de degradação lenta do acetato de celulose. Entretanto, para o filme contendo 1,0% (v/v) de acetato de geranila foi verificada uma alteração na superfície, o que pode estar vinculada a remoção do acetato de geranila presente na superfície deste filme e migração para a solução de PBS. Para verificar se a liberação de fato ocorreu, foi realizado o ensaio *in vitro* de liberação do acetato de celulose, sendo que esta análise permitiu verificar que, caso o acetato de geranila tenha sido liberado da matriz polimérica durante os 60 dias de análise, migrando para a solução de PBS, ocorreu em concentração inferior a  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , insuficiente para causar danos toxicológicos nos organismos vivos.

Este resultado é interessante, pois mesmo ocorrendo a liberação do acetato de geranila em pequenas quantidades, uma parcela importante permanece na matriz polimérica e poderá manter a atividade antimicrobiana do material implantado por um longo período de tempo – o que instiga um estudo mais detalhado sobre o perfil de liberação do agente antimicrobiano da matriz polimérica e a atividade antimicrobiana associada ao material.

Finalmente, de acordo com os resultados elencados o objetivo da tese foi alcançado com êxito, pois foi possível obter um filme de acetato de celulose antibacteriano e antifúngico,



biocompatível e com boas propriedades térmicas e mecânicas, por meio da incorporação do acetato de geranila pelo método de *casting*.

## CAPÍTULO 7

### CONCLUSÕES

A presente tese figura como estudo inicial de um novo material antimicrobiano de acetato de celulose pela incorporação de acetato de geranila, sendo que informações relevantes foram obtidas no decorrer do estudo, destacando-se:

- Foi possível obter, por meio da técnica de *casting*, um filme antimicrobiano de acetato de celulose por meio da incorporação de acetato de geranila, nas concentrações de 0,5% e 1,0% em volume;
- Os filmes antimicrobianos obtidos foram capazes de inibir o crescimento de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*Escherichia coli*) e também de fungos (*Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*), sendo que a atividade está associada a presença do acetato de geranila, pois a propriedade foi mais pronunciada para os filmes contendo 1,0 % de acetato de geranila;
- As análises química (FTIR) e térmica (TGA) confirmaram que o acetato de geranila foi incorporado aos filmes, mas não foram encontradas evidências de novas ligações químicas entre o acetato de celulose e o acetato de geranila;
- Por meio da TGA, foi possível observar dois eventos de degradação exclusivos para os filmes com acetato de geranila, o que é uma forte evidência de que a degradação desse composto ocorre em duas etapas quando é inserido em filmes de acetato de celulose, ou seja, uma parcela do agente antimicrobiano fica mais exposta, enquanto outra parcela fica incorporada no volume do filme, sendo liberada somente quando o acetato de celulose é degradado;
- A análise de DSC sugeriu a compatibilidade entre o acetato de celulose e o acetato de geranila, sendo que os filmes apresentaram uma temperatura de transição vítrea comum e bem definida para o resfriamento e para o segundo aquecimento;
- As propriedades mecânicas dos filmes de acetato de celulose não foram modificadas pela incorporação do acetato de geranila e, mesmo que os filmes tenham apresentado resultados de dispersão que refletem sua heterogeneidade, foi possível perceber que o módulo de elasticidade e a resistência à tração encontrados para todas as amostras estão na faixa comumente relatada para o acetato de celulose;

- A adição do acetato de geranila não modificou o comportamento mecânico dos filmes de acetato de celulose quanto à rigidez e resistência à tração;
- O acetato de geranila incorporado nos filmes de acetato de celulose não causou nenhuma reação estranha ao tecido do animal, sugerindo que a biocompatibilidade do biomaterial foi mantida mesmo com a presença de agente antimicrobiano, como os experimentos *in vivo* indicaram;
- Mesmo após 21 dias de procedimento cirúrgico, foi possível identificar os filmes implantados no tecido dos animais, o que indica que este biomaterial não foi degradado, fato este que foi corroborado teste de degradação *in vitro*, o qual demonstrou que nenhum dos filmes apresentou alta taxa de perda de massa durante 60 dias, sendo que o acetato de geranila também não influenciou na degradação do material;
- Conforme sinalizado pelo estudo de liberação do acetato de geranila, caso o agente antimicrobiano tenha sido liberado da matriz polimérica após 60 dias, foi em quantidade muito baixa ( $<0,5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), sendo este um indício de que a atividade antimicrobiana dos filmes pode permanecer no material por, no mínimo, este período;
- Assim, é possível concluir que os filmes de acetato de celulose incorporados com acetato de geranila possuem atividade antimicrobiana e parecem ter sua biocompatibilidade atestada, o que sinaliza a potencial aplicação deste material na área biomédica e de embalagens ativas para alimentos.

## CAPÍTULO 8

### SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A presente tese foi precursora no estudo de incorporação de um éster antimicrobiano, o acetato de geranila, em uma matriz polimérica natural biocompatível e biodegradável, o acetato de celulose. Muito embora as principais perguntas tenham sido respondidas, novos questionamentos surgem durante o desenvolvimento do trabalho, o que impulsiona a continuação da pesquisa. Desta maneira, seguem algumas sugestões para estudos futuros:

- Estudar a atividade antibacteriana e antifúngica dos filmes frente a outros microrganismos;
- Realizar o teste de contagem de microrganismos sobreviventes ao longo do tempo (curva de morte) considerando menores tempos de amostragem;
- Estudar outras características do filme polimérico desenvolvido, as quais são de interesse específico para a área de embalagens ativas de alimentos, como por exemplo propriedades ópticas, permeabilidade ao vapor d'água, além da avaliação da capacidade do filme desenvolvido em estender a vida de prateleira de alimentos;
- Estudar a influência da incorporação do acetato de geranila na biodegradação em solo dos filmes de acetato de celulose;
- Fazer um estudo cinético de liberação do éster da matriz polimérica, utilizando uma metodologia com maior sensibilidade;
- Verificar se a atividade antimicrobiana dos filmes permanece com o passar do tempo;
- Realizar o estudo da citocompatibilidade e da hemocompatibilidade dos filmes antimicrobianos;
- Estudar em maiores detalhes a degradação dos filmes poliméricos em organismos vivos;
- Desenvolver um dispositivo biomédico com o material obtido no presente estudo.

## CAPÍTULO 9

### REFERÊNCIAS

ABOU-YOUSEF, H.; SABER, E.; ABDEL-AZIZ, M. S.; KAMEL, S. Efficient alternative of antimicrobial nanocomposites based on cellulose acetate/Cu-NPs. **Soft Materials**, v. 16, p. 141–150, 2018. DOI: 10.1080/1539445X.2018.1457540.

ABREU, A. S.; OLIVEIRA, M.; DE SÁ, A.; RODRIGUES, R. M.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A.; MACHADO, A. V. Antimicrobial nanostructured starch based films for packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 127–134, 2015. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.04.021.

AHMED, J.; MULLA, M.; JACOB, H.; LUCIANO, G.; BINI, T. B.; ALMUSALLAM, A. Polylactide/poly( $\epsilon$ -caprolactone)/zinc oxide/clove essential oil composite antimicrobial films for scrambled egg packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 21, p. 1–9, 2019. DOI: 10.1016/j.fpsl.2019.100355.

ALBANNA, M. Z.; BOU-AKL, T.H.; WALTERS, H.L.; MATTHEW, H.W. T. Improving the mechanical properties of chitosan-based heart valve scaffolds using chitosan fibers. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 5, p. 171-180, 2012. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2011.08.021.

AL-JAHWARI, F. S., & PERVEZ, T. (2020). The Potential of Environmental-Friendly Biopolymers as an Alternative to Conventional Petroleum-Based Polymers. **Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials**, 200–206. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.11295-0>

ARAÚJO, G. K. P.; DE SOUZA, S. J.; DA SILVA, M. V.; YAMASHITA, F.; GONÇALVES, O. H.; LEIMANN, F. V.; SHIRAI, M. A. Physical, antimicrobial and antioxidant properties of starch-based film containing ethanolic propolis extract. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 2080–2087, 2015. DOI: 10.1111/ijfs.12869.

ASADI, N., DEL BAKHSHAYESH, A. R., DAVARAN, S., & AKBARZADEH, A. (2020). Common biocompatible polymeric materials for tissue engineering and regenerative medicine. **Materials Chemistry and Physics**, 242, 122528.  
<https://doi.org/10.1016/J.MATCHEMPHYS.2019.122528>

ASHFAQ, M.; VERMA, N.; KHAN, S. Highly effective Cu/Zn-carbon micro/nanofiber-polymer nanocomposite-based wound dressing biomaterial against the *P. aeruginosa* multi- and extensively drug-resistant strains. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 630-641, 2017. DOI: 10.1016/j.msec.2017.03.187

ASSIS, R. Q., PAGNO, C. H., STOLL, L., RIOS, P. D. A., RIOS, A. DE O., & OLIVERA, F. C. (2021). Active food packaging of cellulose acetate: Storage stability, protective effect on oxidation of riboflavin and release in food simulants. **Food Chemistry**, 349.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129140>

ATILA, D.; KESKIN, D.; TEZCANER, A. Crosslinked pullulan/cellulose acetate fibrous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 69, p. 1103-1115, 2016. DOI: 10.1016/j.msec.2016.08.015.

AUGUSTINE, R.; HASAN, A. Emerging applications of biocompatible phytosynthesized metal/metal oxide nanoparticles in healthcare. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, p. 1-12, 2020. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101516.

AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 111-122, 2004. DOI: 10.1016/j.carbpol.2003.11.015.

AXINTE, D.; GUO, Y.; LIAO, Z.; SHIH, A. J.; M'SAOUBI, R.; SUGITA, N. AZHAR, O., JAHAN, Z., SHER, F., NIAZI, M. B. K., KAKAR, S. J., & SHAHID, M. (2021). Cellulose acetate-polyvinyl alcohol blend hemodialysis membranes integrated with

dialysis performance and high biocompatibility. **Materials Science and Engineering: C**, 126, 112127. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2021.112127>

BAEK, J., RAMASAMY, M., WILLIS, N. C., KIM, D. S., ANDERSON, W. A., & TAM, K. C. (2021). Encapsulation and controlled release of vitamin C in modified cellulose nanocrystal/chitosan nanocapsules. **Current Research in Food Science**, 4, 215–223. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2021.03.010>

BAHMID, N. A., DEKKER, M., FOGLIANO, V., & HEISING, J. (2021). Development of a moisture-activated antimicrobial film containing ground mustard seeds and its application on meat in active packaging system. **Food Packaging and Shelf Life**, 30, 100753. <https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2021.100753>

BASTANTE, C. C., SILVA, N. H. C. S., CARDOSO, L. C., SERRANO, C. M., MARTÍNEZ DE LA OSSA, E. J., FREIRE, C. S. R., & VILELA, C. (2021). Biobased films of nanocellulose and mango leaf extract for active food packaging: Supercritical impregnation versus solvent casting. **Food Hydrocolloids**, 117, 106709. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2021.106709>

BLAŽEKOVIĆ, B.; YANG, W.; WANG, Y.; LI, C.; KINDL, M.; PEPELJNJAK, S.; VLADIMIR-KNEŽEVIĆ, S. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Lavandula × intermedia* ‘Budrovka’ and *L. angustifolia* cultivated in Croatia. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 173-182, 2018. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.06.041.

BOURKAIB, M.C.; RANDRIAMALALA, H.; DETTORI, L.; HUMEAU, C.; DELAUNAY, S.; CHEVALOT, I.; GUIAVARC’H, Y. Enzymatic synthesis of geranyl acetate in packed bed reactor in supercritical carbon dioxide under various pressure-temperature conditions and reactor configurations, **Process Biochemistry**, v. 71, p. 118-126, 2018. DOI: 10.1016/j.procbio.2018.05.008.

CARVALHO, D. M.; TAKEUCHI, K. P.; GERALDINE, R. M.; MOURA, C. J.; SILVEIRA, M. F. A. Active film of cellulose acetate incorporated with nanosuspension of curcumin. **Polímeros**, v. 27, p. 70-76, 2017. DOI: 10.1590/0104-1428.2232.

CASARIN, S. A., AGNELLI, J. A. M., MALMONGE, S. M., ROSÁRIO, F. Blendas PHB/copoliésteres biodegradáveis – biodegradação em solo. **Polímeros**, v. 23, n. 1, p. 115-122, 2013. DOI: 10.1590/S0104-14282013005000003.

CASTILLO-ORTEGA, M. M.; NÁJERA-LUNA, A.; RODRÍGUEZ-FÉLIX, D. E.; ENCINAS, J. C.; RODRÍGUEZ-FÉLIX, F.; ROMERO, J.; HERRERA-FRANCO, P. J. Preparation, characterization and release of amoxicillin from cellulose acetate and poly(vinyl pyrrolidone) coaxial electrospun fibrous membranes. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, p. 1772-1778, 2011. DOI: 10.1016/j.msec.2011.08.009.

CERQUEIRA, D. A.; FILHO, G. R.; CARVALHO, R. D. A.; VALENTE, A. J. M. Caracterização de acetato de celulose obtido a partir do bagaço de cana-de-açúcar por <sup>1</sup>H-RMN. **Polimeros**, v. 20, p. 85-91, 2010. DOI: 10.1590/S0104-14282010005000017.

CHAINOGLU, E.; KARAGKIOZAKI, V.; CHOLI-PAPADOPOULOU, T.; MAVROMANOLIS, C.; LASKARAKIS, A.; LOGOTHETIDIS, S. Development of Biofunctionalized Cellulose Acetate Nanoscaffolds for Heart Valve Tissue Engineering. **World Journal of Nano Science and Engineering**, v. 6, p. 129-152, 2016. DOI: 10.4236/wjnse.2016.64013.

CHEN, B. K.; SHEN, C. H.; CHEN, S. C.; CHEN, A. F. Ductile PLA modified with methacryloyloxyalkyl isocyanate improves mechanical properties. **Polymer**, v. 51, p. 4667-4672, 2010. DOI: 10.1016/j.polymer.2010.08.028.

CHEN, W.; SU, Y.; ZHENG, L.; WANG L.; JIANG, Z. The improved oil/water separation performance of cellulose acetate-graft-polyacrylonitrile membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 337, p. 98-105, 2009. DOI: 10.1016/j.memsci.2009.03.029.



CHEUNG, C. W.; PLOEGER, M. L.; HU, X. Direct amidation of esters with nitroarenes. **Nature Communications**, v. 8, p. 1-10, 2017. DOI: 10.1038/ncomms14878.

COLOBATIU, L.; GAVAN, A.; POTARNICHE, A. V.; RUS, V.; DIACONEASA, Z.; MOCAN, A.; TOMUTA, I.; MIREL, S.; MIHAIU, M. Evaluation of bioactive compounds-loaded chitosan films as a novel and potential diabetic wound dressing material. **Reactive and Functional Polymers**, v. 145, p. 1-7, 2019. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104369.

COROBEA, M. C.; MUHULET, O.; MICULESCU, F.; ANTONIAC, I. V.; VULUGA, Z.; FLOREA, D.; VULUGA, D. M.; BUTNARU, M.; IVANOV, D.; VOICU, S. I.; THAKUR, V. K. Novel nanocomposite membranes from cellulose acetate and clay-silica nanowires. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 27, p. 1586-1595. DOI: 10.1002/pat.3835.

DAIRI, N.; FERFERA-HARRAR, H.; RAMOS, M.; GARRIGÓS, M. C. Cellulose acetate/AgNPs-organoclay and/or thymol nano-biocomposite films with combined antimicrobial/antioxidant properties for active food packaging use. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 508-523, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.042.

DANNENBERG, G. S.; FUNCK, G. D.; CRUXEN, C. E. S.; MARQUES, J. L.; SILVA, W. P.; FIORENTINI, A. M. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 314-318, 2017. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.04.002.

DAS, S.; SINGH, V. K.; DWIVEDY, A. K.; CHAUDHARI, A. K.; UPADHYAY, N. SINGH, A.; DEEPIKA; DUBEY, N. K. Antimicrobial activity, antiaflatoxigenic potential and in situ efficacy of novel formulation comprising of *Apium graveolens* essential oil and its major component. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.160, p. 102-111, 2019. DOI: 10.1016/j.pestbp.2019.07.013.

DE FARIA, A. F.; DE MORAES, A. C. M.; ANDRADE, P. F.; DA SILVA, D. S.; DO CARMO GONÇALVES, M.; ALVES, O. L. Cellulose acetate membrane embedded with

graphene oxide-silver nanocomposites and its ability to suppress microbial proliferation. **Cellulose**, v. 24, p. 781-796, 2017. DOI: 10.1007/s10570-016-1140-6.

DENG, Y.; ZHOU, P.; LIU, X.; WANG, L.; XIONG, X.; TANG, Z.; WEI, J.; WEI, S. Preparation, characterization, cellular response and *in vivo* osseointegration of polyetheretherketone/nano-hydroxyapatite/carbon fiber ternary biocomposite. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 64-73, 2015. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.09.001.

DJIHANE, B.; WAFI, N.; ELKHAMSSA, S.; PEDRO, D. H. J.; MARIA, A. E.; MIHOUB, Z. M. Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, p. 780-787, 2017. DOI: 10.1016/j.jsps.2016.11.001.

DOS SANTOS, A. E. A., DOS SANTOS, F. V., FREITAS, K. M., PIMENTA, L. P. S., DE OLIVEIRA ANDRADE, L., MARINHO, T. A., DE AVELAR, G. F., DA SILVA, A. B., & FERREIRA, R. V. (2021). Cellulose acetate nanofibers loaded with crude annatto extract: Preparation, characterization, and *in vivo* evaluation for potential wound healing applications. **Materials Science and Engineering C**, 118. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111322>

DOS SANTOS, V.; BRANDALISE, R. N.; SAVARIS, M. **Engineering of Biomaterials**. Cham: Springer, 2017.

EL FAWAL, G. F.; OMER, A. M.; TAMER, T. M. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities for cellulose acetate films incorporated with Rosemary and Aloe Vera essential oils. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p. 1510–1518, 2019. DOI: 10.1007/s13197-019-03642-8.

ESMAEILI, E., ESLAMI-ARSHAGHI, T., HOSSEINZADEH, S., ELAHIRAD, E., JAMALPOOR, Z., HATAMIE, S., & SOLEIMANI, M. (2020). The biomedical potential of cellulose acetate/polyurethane nanofibrous mats containing reduced graphene oxide/silver nanocomposites and curcumin: Antimicrobial performance and cutaneous wound healing.

**International Journal of Biological Macromolecules**, 152, 418–427.

<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.02.295>

FARIA, J., DIONÍSIO, B., SOARES, Í., BAPTISTA, A. C., MARQUES, A., GONÇALVES, L., BETTENCOURT, A., BALEIZÃO, C., & FERREIRA, I. (2022). Cellulose acetate fibres loaded with daptomycin for metal implant coatings. **Carbohydrate Polymers**, 276, 118733.

<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118733>

FELGUEIRAS, H. P., TEIXEIRA, M. A., TAVARES, T. D., & AMORIM, T. M. P. (2020). New method to produce poly(vinyl alcohol)/cellulose acetate films with improved antibacterial action. **Materials Today: Proceedings**, 31, S269–S272.

<https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2019.12.100>

FLORES, C.; LOPEZ, M.; TABARY, N.; NEUT, C.; CHAI, F.; BETBEDER, D.; HERKT, C; CAZAUX, F.; GAUCHER, V.; MARTEL, B.; BLANCHEMAIN, N. Preparation and characterization of novel chitosan and  $\beta$ -cyclodextrin polymer sponges for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 173, p. 535-546, 2017. DOI:

10.1016/j.carbpol.2017.06.026.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Title 21 - Food and drugs. Chapter I - Food and drug administration, department of health and human services. Subchapter B - Food for human consumption (continued). Part 182 - Substances generally recognized as safe.

Abril/2019. Acesso em: abril/2022. Disponível em:

<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?fr=182.60&SearchTerm=geraniol..>

GAO, S.; LV, Y.; YUAN, L.; REN, H.; WU, T.; LIU, B.; ZHANG, Y.; ZHOU, R.; LI, A.; ZHOU, F. Improved bone ingrowth of tricalcium phosphate filled Poly(methyl methacrylate) (PMMA) bone cements *in vivo*. **Polymer Testing**, v. 76, p. 513-521, 2019. DOI:

10.1016/j.polymertesting.2019.02.015.

GEBRU, K. A.; DAS, C. Removal of chromium (VI) ions from aqueous solutions using amine-impregnated TiO<sub>2</sub> nanoparticles modified cellulose acetate membranes. **Chemosphere**, v. 191, p. 673-684, 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.107.

GEORGE GONÇALVES DOS SANTOS, SÔNIA MARIA OLIVEIRA CAVALCANTI MARINHO, F. B. M. (2010). ARTIGO DE REVISÃO Polímeros como biomateriais para o tecido cartilaginoso Polymers as biomaterials for cartilaginous tissue. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 1677–5090, 367–373.

GLICERINA, V., SIROLI, L., CANALI, G., CHINNICI, F., CAPELLI, F., LANCIOTTI, R., COLOMBO, V., & ROMANI, S. (2021). Efficacy of biodegradable, antimicrobial packaging on safety and quality parameters maintenance of a pear juice and rice milk-based smoothie product. *Food Control*, 128, 108170. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2021.108170>

GOMAA, S. F.; MADKOUR, T. M.; MOGHANNEM, S.; EL-SHERBINY, I. M. New polylactic acid/ cellulose acetate-based antimicrobial interactive single dose nanofibrous wound dressing mats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1148-1160, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.145.

GONÇALVES, M. J.; CRUZ, M. T.; TAVARES, A. C.; CAVALEIRO, C.; LOPES, M. C.; CANHOTO, J.; SALGUEIRO, L.. Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 166-171, 2012. DOI: 10.1016/j.indcrop.2011.06.030.

GOPI, S.; BALAKRISHNAN, P.; CHANDRADHARA, D.; POOVATHANKANDY, D.; THOMAS, S. General scenarios of cellulose and its use in the biomedical field. **Materials Today Chemistry**, v. 13, p. 59-78, 2019. DOI: 10.1016/j.mtchem.2019.04.012

GORDON, T.; PERLSTEIN, B.; HOUBARA, O.; FELNER, I.; BANIN, E.; MARGEL, S. Synthesis and characterization of zinc/iron oxide composite nanoparticles and their antibacterial properties. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 374, p. 1-8, 2011. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2010.10.015

GOUMA, P.; XUE, R.; GOLDBECK, C. P.; PERROTTA, P.; BALÁZSI, C. Nano-hydroxyapatite—Cellulose acetate composites for growing of bone cells. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, p. 607–612, 2012. DOI: 10.1016/j.msec.2011.12.019.

GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, M.; ESCOBAR-BARRIOS, V.; POZOS-GUILLÉN, A.; Escobar-García, D. RGD-functionalization of PLA/starch scaffolds obtained by electrospinning and evaluated *in vitro* for potential bone regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 96, p. 798-806, 2019. DOI: 10.1016/j.msec.2018.12.003.

HASSAN, M.; DAVE, K.; CHANDRAWATI, R.; DEHGHANI, F.; GOMES, V. G. 3D printing of biopolymer nanocomposites for tissue engineering: Nanomaterials, processing and structure-function relation. **European Polymer Journal**, v. 121, p. 1-15, 2019. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2019.109340.

HASSANAJILI, S.; KARAMI-POUR, A.; ORYAN, A.; TALAEI-KHOZANI, T. Preparation and characterization of PLA/PCL/HA composite scaffolds using indirect 3D printing for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 104, p. 1-13, 2019. DOI: 10.1016/j.msec.2019.109960.

HU, S.; CAI, X.; QU, X.; YU, B.; YAN, C.; YANG, J.; LI, F.; ZHENG, Y.; X. Preparation of biocompatible wound dressings with long-term antimicrobial activity through covalent bonding of antibiotic agents to natural polymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 1320-1330, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.122.

HUANG, H.; DEAN, D. 3-D printed porous cellulose acetate tissue scaffolds for additive manufacturing. **Additive Manufacturing**, v.31, p. 1–10, 2020. DOI: 10.1016/j.addma.2019.100927.

INDUMATHI, M. P.; SARAL SAROJINI, K.; RAJARAJESWARI, G. R. Antimicrobial and biodegradable chitosan/cellulose acetate phthalate/ZnO nano composite films with optimal oxygen permeability and hydrophobicity for extending the shelf life of black grape fruits.

**International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 1112-1120, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.171

İŞCAN, G.. Antibacterial and Anticandidal Activities of Common Essential Oil Constituents. **Records of Natural Products**, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 374-388, 2017. Research Gate. <https://www.researchgate.net/publication/317318818>.

ISHIGAKI, T.; SUGANO, W.; IKE, M.; FUJITA, M. Enzymatic degradation of cellulose acetate plastic by novel degrading bacterium *Bacillus* sp. S2055. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, p.400-405, 2000. DOI: 10.1016/S1389-1723(01)80008-6.

JATOI, A. W.; KIM, I. S.; NI, Q. Q. Cellulose acetate nanofibers embedded with AgNPs anchored TiO<sub>2</sub> nanoparticles for long term excellent antibacterial applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, p. 640-649, 2019. DOI: /10.1016/j.carbpol.2018.12.029.

KEE, C. M.; IDRIS, A. Permeability performance of different molecular weight cellulose acetate hemodialysis membrane. **Separation and Purification Technology**, v. 75, p. 102-113, 2010. DOI: 10.1016/j.seppur.2010.08.013.

KIM, J. J.; KIM, K.; CHOI; Y. S., KANG, H.; KIM, D. M.; LEE, J. C. Polysulfone based ultrafiltration membranes with dopamine and nisin moieties showing antifouling and antimicrobial properties. **Separation and Purification Technology**, v. 203, p. 9-20, 2018.

DOI: 10.1016/j.seppur.2018.03.033

KREPKER, M., SHEMESH, R., DANIN POLEG, Y., KASHI, Y., VAXMAN, A., & SEGAL, E. (2017). Active food packaging films with synergistic antimicrobial activity. **Food Control**, 76, 117–126. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2017.01.014>

KREUTZ, T., CARNEIRO, S. B., SOARES, K. D., LIMBERGER, R. P., APEL, M. A., VEIGA-JUNIOR, V. F., & KOESTER, L. S. (2021). Aniba canelilla (Kunth) Mez essential oil-loaded nanoemulsion: Improved stability of the main constituents and in vitro antichemotactic activity. **Industrial Crops and Products**, 171, 113949. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2021.113949>

LEI, L., HUANG, W., LIU, K., LIU, X., DAI, M., LIU, Z., & ZHIAO, Y. (2022). Trilazad mesylate-loaded electrospun cellulose acetate nanofibrous wound dressings promote diabetic wound healing by modulation of immune response and protection against oxidative damage. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 69, 102863. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2021.102863>

LI, F.; FEI, P.; CHENG, B.; MENG, J.; LIAO, L. Synthesis, characterization and excellent antibacterial property of cellulose acetate reverse osmosis membrane via a two-step reaction. **Carbohydrate Polymers**, v. 216, p. 312-321, 2019. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.04.026.

LI, R.; LIU, L.; YANG, F. Removal of aqueous Hg(II) and Cr(VI) using phytic acid doped polyaniline/cellulose acetate composite membrane. **Journal of Hazardous Materials**, v. 280, p. 20-30, 2014. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.07.052.

LIAKOS, I. L.; D'AUTILIA, F.; GARZONI, A.; BONFERONI, C.; SCARPELLINI, A.; BRUNETTI, V.; CARZINO, R.; BIANCHINI, P.; POMPA, P. P.; ATHANASSIOU, A. All natural cellulose acetate—Lemongrass essential oil antimicrobial nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 510, p. 508-515, 2016 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.01.060.

LIAKOS, I. L.; IORDACHE, F.; CARZINO, R.; SCARPELLINI, A.; ONETO, M.; BIANCHINI, P.; GRUMEZESCU, A. M.; A. M. Cellulose acetate - essential oil nanocapsules with antimicrobial activity for biomedical applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 172, p. 471-479, 2018. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.08.069

LIAO, N.; UNNITHAN, A. R.; JOSHI, M. K.; TIWARI, A. P.; HONG, S. T.; PARK, C.; KIM, C. S. Electrospun bioactive poly ( $\epsilon$ -caprolactone)—cellulose acetate—dextran antibacterial composite mats for wound dressing applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 469, p. 194–201, 2015. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.01.022.

LICCIARDELLO, F.; KHARCHOUFI, S.; MURATORE, G.; RESTUCCIA, C. Effect of edible coating combined with pomegranate peel extract on the quality maintenance of white shrimps (*Parapenaeus longirostris*) during refrigerated storage. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 17, p. 114-119, 2018. DOI: 10.1016/j.fpsl.2018.06.009.

LIMA REIS, P. M. C., MEZZOMO, N., AGUIAR, G. P. S., HOTZA, D., BAGGIO RIBEIRO, D. H., SALVADOR FERREIRA, S. R., & HENSE, H. (2020). Formation, stability and antimicrobial activity of laurel leaves essential oil (*Laurus nobilis* L.) particles in suspension obtained by SFEE. **The Journal of Supercritical Fluids**, 166, 105032. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2020.105032>

Machining of biocompatible materials — Recent advances. **CIRP Annals**, v. 68, p. 629-652, 2019. DOI: 10.1016/j.cirp.2019.05.003.

MACUVELE, D. L. P.; COLLA, G.; CESCO, K.; RIBEIRO, L. F. B.; DA COSTA, C. E.; NONES, J.; BREITENBACH, E. R.; PORTO, L. M.; SOARES, C.; FIORI, M. A.; RIELLA, H. G. UHMWPE/HA biocomposite compatibilized by organophilic montmorillonite: An evaluation of the mechanical-tribological properties and its hemocompatibility and performance in simulated blood fluid. **Materials Science and Engineering: C**, v. 100, p. 411-423, 2019. DOI: 10.1016/j.msec.2019.02.102.

MANSOURIZADEH, A.; JAVADI AZAD, A. Preparation of blend polyethersulfone/cellulose acetate/polyethylene glycol asymmetric membranes for oil-water separation. **Journal of Polymer Research**, v. 375, p. 1-9, 2014. DOI: 10.1007/s10965-014-0375-x.

MARTINS, P.; SBAITE, P.; BENITES, C.; MACIEL, M. Thermal characterization of orange, lemongrass, and basil essential oils. **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, p. 463-468, 2011. DOI: 10.3303/CET1124078.

MCCMAHON, S.; BERTOLLO, N.; CEARBHAILL, E. D.O.; SALBER, J.; PIERUCCI, L.; DUFFY, P.; DÜRIG, T.; BI, V.; WANG, W. Bio-resorbable polymer stents: a review of



material progress and prospects. **Progress in Polymer Science**, v. 83, p. 79-96, 2018. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2018.05.002.

MILOVANOVIC, S.; MARKOVIC, D.; AKSENTIJEVIC, K.; STOJANOVIC, D. B.; IVANOVIC, J.; ZIZOVIC, I. Application of cellulose acetate for controlled release of thymol. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 344-353, 2016. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.03.093.

MODULEVSKY, DANIEL J.; CUERRIER, CHARLES M.; PELLING, ANDREW E. Biocompatibility of subcutaneously implanted plant-derived cellulose biomaterials. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0157894, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157894>.

MOHR, L. C.; CAPELEZZO, A. P.; BARETTA, C. R.D.M.; MARTINS, M. A.P.M.; FIORI, M. A.; MELLO, J. M.M. Titanium dioxide nanoparticles applied as ultraviolet radiation blocker in the polylactic acid biodegradable polymer. **Polymer Testing**, v. 77, p. 1-10, 2019. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2019.04.014.

MOREIRA GONÇALVES, S., GOMES MOTTA, J. F., RIBEIRO-SANTOS, R., HIDALGO CHÁVEZ, D. W., & RAMOS DE MELO, N. (2020). Functional and antimicrobial properties of cellulose acetate films incorporated with sweet fennel essential oil and plasticizers. *Current Research in Food Science*, 3, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2020.01.001>

MOSTAFA, N. A., FARAG, A. A., ABO-DIEF, H. M., & TAYEB, A. M. (2018). Production of biodegradable plastic from agricultural wastes. **Arabian Journal of Chemistry**, 11(4), 546–553. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2015.04.008>

MURCIA, M. D.; GÓMEZ, M.; GÓMEZ, E.; GÓMEZ, J. L.; HIDALGO, A. M.; SÁNCHEZ, A.; VERGARA, P. Kinetic modelling and kinetic parameters calculation in the lipase-catalysed synthesis of geranyl acetate. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 138, p. 135-143, 2018 DOI: 10.1016/j.cherd.2018.08.025.  
**Nature**, v. 540 p. 354-362, 2016. DOI: 10.1038/nature21001.

NOSAR, M. N.; SALEHI, M.; GHORBANI, S.; BEIRANVAND, S. P.; GOODARZI, A.; AZAMI, M. Characterization of wet-electrospun cellulose acetate based 3-dimensional scaffolds for skin tissue engineering applications: influence of cellulose acetate concentration. **Cellulose**, v. 23, p. 3239–3248, 2016. DOI 10.1007/s10570-016-1026-7.

NOURI, A.; TAVAKKOLI YARAKI, M.; GHORBANPOUR, M.; WANG, S. Biodegradable  $\kappa$ -carrageenan/nanoclay nanocomposite films containing *Rosmarinus officinalis* L. extract for improved strength and antibacterial performance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 227-235, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.051.

OHLAND, A. L.; SALIM, V. M. M.; BORGES, C. P. Plasma functionalized hydroxyapatite incorporated in membranes for improved performance of osmotic processes. **Desalination**, v. 452, p. 87-93, 2019. DOI: 10.1016/j.desal.2018.11.008.

OPREA M.; VOICU, S. I. Recent advances in composites based on cellulose derivatives for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 247, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116683.

PANDELE, A. M., COMANICI, F. E., CARP, C. A., MICULESCU, F., VOICU, S. I., THAKUR, V.K., SERBAN, B. C. Synthesis and characterization of cellulose acetate-hydroxyapatite micro and nano composites membranes for water purification and biomedical application. **Vacuum**, v. 146, p. 599–605, 2017. DOI: 10.1016/j.vacuum.2017.05.008.

PANDELE, A. M.; NEACSU, P.; CIMPEAN, A.; STARAS, A. I.; MICULESCU, F.; IORDACHE, A.; VOICU, S. I.; THAKUR, V. K.; TOADER, O. D. Cellulose acetate membranes functionalized with resveratrol by covalent immobilization for improved osseointegration. **Applied Surface Science**, v. 438, p. 2–13, 2018. DOI: 10.1016/j.apsusc.2017.11.102.

PANG, L.; GAO, Z.; FENG, H.; WANG, S.; WANG, Q. Cellulose based materials for controlled release formulations of agrochemicals: A review of modifications and applications.

**Journal of Controlled Release**, v. 316, p. 105-115, 2019. DOI:  
10.1016/j.jconrel.2019.11.004

PARK, J. A.; KIM, S. B. Antimicrobial filtration with electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers containing benzyl triethylammonium chloride: Immersion, leaching, toxicity, and filtration tests. **Chemosphere**, v. 167, p. 469-477, 2017. DOI:  
10.1016/j.chemosphere.2016.10.030.

PENG, B., YAO, Z., WANG, X., CROMBEEN, M., GSWEENE, D., & TAM, K. C. (2019). Cellulose-based Materials in Wastewater Treatment of Petroleum Industry. *Green Energy and Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.gee.2019.09.003>

PEREIRA, N. R. L., LOPES, B., FAGUNDES, I. V., DE MORAES, F. M., MORISSO, F. D. P., PARMA, G. O. C., ZEPON, K. M., & MAGNAGO, R. F. (2022). Bio-packaging based on cellulose acetate from banana pseudostem and containing *Butia catarinensis* extracts. **International Journal of Biological Macromolecules**, 194, 32–41.  
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.11.179>

PIRES, A. L. R., BIERHALZ, A. C. K., & MORAES, Â. M. (2015). Biomaterials: Types, applications, and market. **Quimica Nova**, 38(7), 957–971. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>

POLA, C. C.; MEDEIROS, E. A. A.; PEREIRA, O. L.; SOUZA, V. G. L.; OTONI, C. G.; CAMILLOTO, G. P.; SOARES, N. F. F. Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. **Food Packaging and Shelf Life**, v.9, p.69–78, 2016. DOI:  
10.1016/j.fpsl.2016.07.001.

PRIYADARSHI, R.; SAURAJ, KUMAR, B.; DEEBA, F.; KULSHRESHTHA, A.; NEGI, Y. S. Chitosan films incorporated with Apricot (*Prunus armeniaca*) kernel essential oil as active food packaging material. **Food Hydrocolloids**, v. 85, p. 158-166, 2018. DOI:  
10.1016/j.foodhyd.2018.07.003.

PUBCHEM. Open Chemistry Database. **Geranyl acetate**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Geranyl-acetate>. Acesso em: janeiro/2021.

RAMAKRISHNA, S.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E.; LEONG, K.W. Biomedical Applications Of Polymer-composite Materials: A Review. **Composites Science and Technology**, v. 61, p. 1189-1224, 2001. DOI: 10.1016/S0266-3538(00)00241-4.

RAZA, S.; ZHANG, J.; ALI, I.; LI, X.; LIU, C. Recent trends in the development of biomass-based polymers from renewable resources and their environmental applications. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.115, p. 293-302, 2020. DOI: 10.1016/j.jtice.2020.10.013.

RODRIGUES FILHO, G.; RIBEIRO, S. D.; MEIRELES, C. DA S.; DA SILVA, L. G.; RUGGIERO, R.; FERREIRA, M. F.; CERQUEIRA, D. A.; DE ASSUNÇÃO, R. M. N.; ZENI, M.; POLLETO, P. Release of doxycycline through cellulose acetate symmetric and asymmetric membranes produced from recycled agroindustrial residue: Sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 566-571, 2016. DOI:10.1016/j.indcrop.2010.10.037.

RUGGIERO, R., DE ALMEIDA CARVALHO, V., DA SILVA, L. G., DE MAGALHÃES, D., FERREIRA, J. A., DE MENEZES, H. H. M., DE MELO, P. G., & NAVES, M. M. (2015). Study of in vitro degradation of cellulose acetate membranes modified and incorporated with tetracycline for use as an adjuvant in periodontal reconstitution. **Industrial Crops and Products**, 72, 2–6. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.03.021>

SABHARWAL, P. K., CHATTOPADHYAY, S., SINGH, H. Preparation and characterization of antimicrobial, biodegradable, triclosan-incorporated polyhydroxybutyrate-co-valerate films for packaging applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, p. 1-10, 2018. DOI: 10.1002/APP.46862.

SANI, I. K.; PIRSA, S.; TAĞI, S. Preparation of chitosan/zinc oxide/Melissa officinalis essential oil nano-composite film and evaluation of physical, mechanical and antimicrobial

properties by response surface method. **Polymer Testing**, v. 79, p. 1-10. DOI: 10.1016/j.fpsl.2019.100355.

SCHAEFER, E. W., PAVONI, J. M. F., LUCHESE, C. L., FACCIN, D. J. L., & TESSARO, I. C. (2020). Influence of turmeric incorporation on physicochemical, antimicrobial and mechanical properties of the cornstarch and chitosan films. **International Journal of Biological Macromolecules**, 148. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.148>

SHANKAR, S., WANG, L. F., & RHIM, J. W. (2018). Incorporation of zinc oxide nanoparticles improved the mechanical, water vapor barrier, UV-light barrier, and antibacterial properties of PLA-based nanocomposite films. **Materials Science and Engineering: C**, 93, 289–298. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2018.08.002>

SIGMA ALDRICH - Cellulose acetate. Acesso em: junho/2022. Disponível em: [https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/aldrich/180955?gclid=Cj0KCQjwwJuVBhCAARIsAOPwGARwB7nVXQg9lCQZe1rRwlbshxJq8qRWFZCRtKS0afFMCsnIIWD20JUaApyEALw\\_wcB](https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/aldrich/180955?gclid=Cj0KCQjwwJuVBhCAARIsAOPwGARwB7nVXQg9lCQZe1rRwlbshxJq8qRWFZCRtKS0afFMCsnIIWD20JUaApyEALw_wcB)

SILVA, G. G.; VALENTE, M. L. C.; BACHMANN, L.; DOS REIS, A. C. Use of polyethylene terephthalate as a prosthetic component in the prosthesis on an overdenture implant. **Materials Science and Engineering C**, v. 99, p. 1341–1349, 2019. DOI: 10.1016/j.msec.2019.01.136.

SOFI, H. S., AKRAM, T., SHABIR, N., VASITA, R., JADHAV, A. H., & SHEIKH, F. A. (2021). Regenerated cellulose nanofibers from cellulose acetate: Incorporating hydroxyapatite (HAp) and silver (Ag) nanoparticles (NPs), as a scaffold for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering C**, 118. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111547>

TORTELLA, G. R.; RUBILAR, O.; DURÁN, N.; DIEZ, M. C.; MARTÍNEZ, M.; PARADA, J.; SEABRA, A. B. Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment. **In Journal of Hazardous Materials**, v. 390, p. 1-21, 2020. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.121974.

TSIAPLA, A.R.; KARAGKIOZAKI, V.; BAKOLA, V.; PAPPAS, F.; GKERTSIYOU, P.; PAVLIDOU, E.; LOGOTHETIDIS, S. Biomimetic and biodegradable cellulose acetate scaffolds loaded with dexamethasone for bone implants. **Beilstein journal of Nanotechnology**, v. 9, p. 1986–1994, 2018. DOI: 10.3762/bjnano.9.189.

ULLAH, A., ULLAH, S., KHAN, M. Q., HASHMI, M., NAM, P. D., KATO, Y., TAMADA, Y., & KIM, I. S. (2020). Manuka honey incorporated cellulose acetate nanofibrous mats: Fabrication and in vitro evaluation as a potential wound dressing. **International Journal of Biological Macromolecules**, 155. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.237>

VATANKHAH, E.; PRABHAKARAN, M. P.; JIN, G.; MOBARAKEH, L. G.; RAMAKRISHNA, S. Development of nanofibrous cellulose acetate/gelatin skin substitutes for variety wound treatment applications. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 28, p. 909–921, 2014. DOI 0.1177/0885328213486527.

VATANPOUR, V., PASAOGLU, M. E., BARZEGAR, H., TEBER, O. O., KAYA, R., BASTUG, M., KHATAEE, A., & KOYUNCU, I. (2022). Cellulose acetate in fabrication of polymeric membranes: A review. **Chemosphere**, 295(February). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133914>

VOICU, S. I.; CONDRUZ, R. M.; MITRAN, V.; CIMPEAN, A.; MICULESCU, F.; ANDRONESCU, C.; MICULESCU, M.; THAKUR, V. K. Sericin Covalent Immobilization onto Cellulose Acetate Membrane for Biomedical Applications. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, p. 1765–1774, 2016. DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b01756.

WAHEED, H., & HUSSAIN, A. (2019). Effect of Polyvinyl Pyrrolidone on Morphology and Performance of Cellulose Acetate Based Dialysis Membrane. **Engineering, Technology & Applied Science Research**, 9(1). <https://doi.org/10.48084/etasr.2491>

WANG, C.; YU, B.; FAN, Y.; ORMSBY, R. W.; MCCARTHY, H. O.; DUNNE, N.; LI, X. Incorporation of multi-walled carbon nanotubes to PMMA bone cement improves

cytocompatibility and osseointegration. **Materials Science and Engineering C**, v. 103, p. 1–13, 2019. DOI: /10.1016/j.msec.2019.109823

WANG, Y. WANG, C.; XIE, Y.; YANG, Y.; ZHEN, Y.; MENG, H.; HE, W.; QIAO, K. Highly transparent, highly flexible composite membrane with multiple antimicrobial effects used for promoting wound healing. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, p. 1–14, 2019. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.114985.

WANG, Z., GANEWATTA, M. S., & TANG, C. (2020). Sustainable polymers from biomass: Bridging chemistry with materials and processing. In **Progress in Polymer Science** (Vol. 101). <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2019.101197>

WONG, S. W. Y.; ZHOU, G. J.; KWOK, K. W. H.; DJURIŠIĆ, A. B.; HAN, J.; LEE, J. S.; LEUNG, K. M. Y. In vivo toxicities of nine engineered nano metal oxides to the marine diatom *Skeletonema costatum* and rotifer *Brachionus koreanus*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 153, p. 1-12, 2020. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2020.110973.

XIE, J.; HUNG, Y. C. UV-A activated TiO<sub>2</sub> embedded biodegradable polymer film for antimicrobial food packaging application. **LWT - Food Science and Technology**, v. 96, p. 307-314, 2018. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.05.050.

XIONG, J., HUANG, Y., ZHANG, H., HOU, L. Lipase-catalyzed transesterification synthesis of geranyl acetate in organic solvents and its kinetics. **Food Science and Technology Research**, v. 20, p. 207- 216, 2014. DOI: 10.3136/fstr.20.207.

YAKOUT, A. A.; EL-SOKKARY, R. H.; SHREADAH, M. A.; ABDEL HAMID, O. G. (Removal of Cd(II) and Pb(II) from wastewater by using triethylenetetramine functionalized grafted cellulose acetate-manganese dioxide composite. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 406-414, 2016. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.04.038.

YANG, Y. Y.; ZHAO, C. Q.; WANG, L. S.; LIN, J. X.; ZHU, S. Z.; HUANG, H. G. A novel biopolymer device fabricated by 3D printing for simplifying procedures of

pancreaticojejunosomy. **Materials Science and Engineering C**, v. 103, p., 1- 10, 2019. DOI: 10.1016/j.msec.2019.109786.

YI, F.; SUN, J.; BAO, X.; MA, B.; SUN, M. Influence of molecular distillation on antioxidant and antimicrobial activities of rose essential oils. **LWT**, v. 102, p. 310-316, 2019. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.12.051.

ZEFERINO, R. C. F. Síntese de Acetato de Geranila e Acetato de Nerila Via Catálise Heterogênea com Resina de Troca Iônica e Caracterização dos Ésteres para Potenciais Aplicações como Aditivos Antimicrobianos. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química, Florianópolis, 2021, 202p. Disponível em:

<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/231154/PENQ0922-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 12/03/2022.

ZEFERINO, R. C. F.; PIAIA, V. A. A.; ORSO, V. T.; PINHEIRO, C. M.; ZANETTI, M.; COLPANI, G. L.; PADOIN, N.; SOARES, C.; FIORI, M. A.; RIELLA, H. G. Synthesis of geranyl acetate by esterification of geraniol with acetic anhydride through heterogeneous catalysis using ion exchange resin. **Chemical Engineering Research and Design**, v.168, p. 156-168, 2021. DOI: 10.1016/j.cherd.2021.01.031.

ZHANG, H.; HORTAL, M.; JORDÁ-BENEYTO, M.; ROSA, E.; LARA-LLEDO, M.; LORENTE, I. ZnO-PLA nanocomposite coated paper for antimicrobial packaging application. **LWT - Food Science and Technology**, v. 78, p. 250-257, 2017. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.12.024.

ZHONG, Y., GODWIN, P., JIN, Y., & XIAO, H. (2020). Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: A mini-review. In **Advanced Industrial and Engineering Polymer Research** (Vol. 3, Issue 1, pp. 27–35).  
<https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2019.11.002>