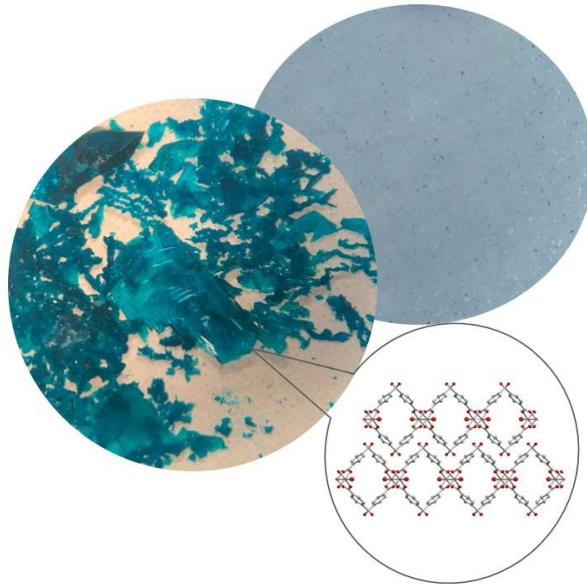




ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA



Desenvolvimento de materiais híbridos dopados com BioMOFs para aplicações antimicrobianas

TELMA GALVÃO GUIU

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica - Bioprocessos

Orientador(es):

Doutora Ana Catarina C. de Sousa (ISEL/IPL)
Doutor Alexander M. Kirillov (IST/UL)

Júri:

Presidente: Doutor Nelson Alberto F. da Silva (ISEL/IPL)

Vogais:

Doutora Carla Isabel M. dos Santos (CQE/IST/UL)
Doutora Elisabete Clara B. do Amaral Alegria (ISEL/IPL)
Doutora Ana Catarina C. de Sousa (ISEL/IPL)

Setembro 2023

Agradecimentos

Este estudo não teria sido possível sem o apoio de muitas pessoas. Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, ao Centro de Química Estrutural e à Faculdade de Ciências, pela disponibilidade e financiamento, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores, Doutora Ana Catarina Sousa e Doutor Alexander Kirillov, que me guiaram, ajudaram e não desistiram de mim, durante esta jornada.

Ao Doutor Chris Hebert por todos os ensinamentos, tempo e disponibilidade no decurso deste trabalho.

Ao Doutor Tiago Fernandes, por me ter integrado na equipa do CQE, por me ter guiado e por toda a disponibilidade e dedicação que dispôs neste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, tanto no ISEL, no IST e na FCUL tive o prazer de trabalhar com pessoas maravilhosas.

À minha família académica, Bruno Gomes, Joana Fernandes e Cristiana Guedes, por todos os bons momentos de lazer e trabalho, e por puxarem por mim nas alturas mais difíceis.

Às minhas amigas e colegas, Patrícia Gomes e Ana Marçalo, que foram o meu grupo de mestrado e o meu grupo em muitos trabalhos, que nos sempre apoiámos umas às outras e assim continuará.

Ao meu namorado e companheiro, Guilherme Rei, uma pessoa muito especial, que nunca me deixou desistir, que sempre me deu força, que tem uma paciência de anjo, e que tem a sua capacidade de mesmo nos momentos mais difíceis animar-me.

Aos meus gatinhos, pelo conforto e companhia durante os serões de escrita.

Por fim, quero agradecer à minha família, às minhas irmãs, pela confidencialidade, compreensão, conforto e força, pela nossa união e amizade, e por me fazerem tão bem; e aos meus pais, por todo o amor, pelo consolo nos momentos mais complicados, pela preocupação, por todos os conselhos incansáveis e por tudo o que fizeram por mim até hoje, será um agradecimento eterno.

Resumo

As infecções nosocomiais estão a tornar-se cada vez mais recorrentes devido ao aumento de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos. Muitas vezes estas infecções podem também estar associadas a biofilmes microbianos, o que complica o tratamento destas infecções. Além disso, os biofilmes podem formar-se em muitos tipos de superfícies, especialmente nos dispositivos médicos invasivos. Razão pela qual há uma necessidade de desenvolver novos materiais bioativos funcionais e eficazes que possam prevenir a formação destes mesmos biofilmes. Uma alternativa às estratégias antibacterianas convencionais pode ser proporcionada por polímeros de coordenação (CPs) bioativos.

Este documento descreve a preparação, caracterização e avaliação da capacidade antimicrobiana de polímeros bioativos de coordenação (bioCPs) produzidos a partir de precursores de sais metálicos de prata(I), cobre(II) e zinco(II) e dos ligandos orgânicos ácidos 4,4'-sulfonildibenzóico (H_2sdba) e 4,4'-oxibis benzóico (H_2obba), bem como a sua incorporação em biopolímeros.

Neste trabalho são descritos sete novos bioCPs: $[Ag_2(sdba)]_n$ (1), $\{[Cu(sdba)\cdot H_2O]\cdot 1.5H_2O\}_n$ (2), $\{[Zn(sdba)\cdot H_2O\cdot NH_3]\cdot 1/2(NH_3)\}_n$ (3), $[Ag_2(obba)]_n$ (4), $[Cu_2(obba)(NH_3)(OH)]_n$ (5a), $[Cu(obba)0.5(NH_3)]_n$ (5b) e $\{[Zn(obba)(NH_3)_2]\}_n$ (6). Todos os bioCPs foram utilizados como dopantes na preparação de filmes de biopolímeros à base de agarose e fécula de batata. Os filmes produzidos foram testados em bactérias *S. aureus* (Gram-positiva) e *E. coli* (Gram-negativa), posteriormente avaliou-se a citotoxicidade destes em células humanas HepG2.

Neste estudo, foi concluído que os filmes compostos por bioCP 1, contendo prata(I), destacam-se como a opção mais promissora para inibir o crescimento bacteriano. Esses filmes demonstraram atividade antibacteriana eficaz contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, sem causar citotoxicidade nas células humanas. Além disso, os filmes à base de bioCP 4 e 6, contendo prata(I) e zinco(II), também apresentaram resultados promissores na inibição bacteriana. Por outro lado, os bioCPs à base de cobre(II) revelaram bioatividade apenas para *S. aureus*, mas não demonstraram eficácia contra *E. coli*.

Palavras-Chave: Materiais Antimicrobianos; Biofilmes; Polímeros de Coordenação; Prata(I); Cobre(II); Zinco(II); Biopolímeros; Citotoxicidade; Inibição Bacteriana.

Abstract

Nosocomial infections are becoming increasingly recurrent due to the increase in antibiotic-resistant bacterial strains.

These infections are often associated with microbial biofilms, which complicates the treatment of these infections. Additionally, biofilms can form on many types of surfaces, especially invasive medical devices. Thus, there is a need to develop new and effective bioactive materials that can prevent the formation of biofilms. An alternative to conventional antibacterial strategies is provided by bioactive progressive polymers (CPs).

This work describes the ability to prepare, characterize and evaluate antimicrobial bioactive coordination polymers (bioCPs) produced from precursors of metallic salts of silver, copper and zinc and the organic ligands 4,4'-sulfonyldibenzoic acid (H_2sdba) and benzoic 4,4'-oxybis (H_2obba).

It was obtained seven novel bioCPs: $[Ag_2(sdba)]_n$ (1), $\{[Cu(sdba)\cdot H_2O]\cdot 1.5H_2O\}_n$ (2), $\{[Zn(sdba)\cdot H_2O\cdot NH_3]\cdot 1/2(NH_3)\}_n$ (3), $[Ag_2(obba)]_n$ (4), $[Cu_2(obba)(NH_3)(OH)]_n$ (5a), $[Cu(obba)0.5(NH_3)]_n$ (5b) and $\{[Zn(obba)(NH_3)_2]\}_n$ (6). All bioCPs were used as dopants for the preparation of agarose and potato starch-based biopolymer films. The films produced were tested on the bacteria *S. aureus* (Gram-positive) and *E. coli* (Gram-negative), and their cytotoxicity on human HepG2 cells was subsequently evaluated.

In this study, it was concluded that films composed of bioCP 1, containing silver(I), stand out as the most promising option for inhibiting bacterial growth. These films demonstrated effective antibacterial activity against the bacteria *S. aureus* and *E. coli*, without causing cytotoxicity in human cells. Furthermore, films based on bioCP 4 and 6, containing silver(I) and zinc(II), also showed promising results in bacterial inhibition. On the other hand, copper(II)-based bioCPs revealed bioactivity only when *S. aureus*, but did not demonstrate efficacy against *E. coli*.

Keywords: Bioactive Materials; Biofilms; Coordination Polymers; Silver(I); Copper(II); Zinc(II); Biopolymers; Cytotoxicity; Bacterial Inhibition.

Divulgação Científica

Com os resultados aqui descritos a foi produzido um artigo:

- Tiago A. Fernandes, Filipa Macedo, Rafaela G. Cabral, Telma Guiu, Chris H. J. Franco, Paula Jorge, Ana Catarina Sousa, Vânia André, Nuno Cerca, e Alexander M. Kirillov, “*Sulfonyldibenzoate Coordination Polymers as Bioactive Dopants for Polysaccharide Films with Antibacterial and Antibiofilm Properties*”, *RSC Appl. Interfaces*, 2023.

Parte dos resultados deste trabalho também apresentados em conferências/encontros nacionais, em comunicações em painel:

- Rafaela G. Cabral, Tiago A. Fernandes, Filipa Macedo, Paula Jorge, Chris H.J. Franco, Telma Guiu, Vânia André, Ana C. Sousa, Nuno Cerca, Alexander M. Kirillov, Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Hybrid Biopolymer Films Doped with Bioactive Coordination Compounds, XXVIII Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, University of Aveiro, Aveiro, 23th-26th July 2023.
- Rafaela G. Cabral, Filipa Macedo, Telma Guiu, Tiago A. Fernandes, Paula Jorge, Chris H. Franco, Vânia André, Ana C. Sousa, Nuno Cerca, Alexander M. Kirillov, Hybrid biopolymer films doped with bioactive coordination compounds: synthesis, characterization and antimicrobial activity, CQE Days 2023, Lisbon 25-26 May 2023.

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Divulgação Científica.....	iv
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas.....	xi
Abreviaturas e Siglas	xii
1. Introdução	3
1.1. Biofilmes	3
1.2. Bactérias.....	3
1.2.1. Bactérias Gram-positivas	4
1.2.2. Bactérias Gram-negativas.....	5
1.3. A necessidade de novos agentes antibacterianos.....	6
1.4. Polímeros de coordenação	7
1.4.1. Síntese.....	7
1.4.2. Metais	9
1.4.3. Ligandos	11
1.5.4 Aplicações antibacterianas	12
1.5.5 Modo de atuação dos bioMOFs.....	13
1.6 Filmes biodegradáveis	15
1.6.1 Agarose	15
1.6.2 Fécula de batata	16
2. Considerações Gerais	20
3. Parte Experimental	24
3.1. Síntese de bioCPs	24
3.1.1. Síntese dos bioCPs com o ligando ácido 4,4' – sulfonildibenzóico (H ₂ sdba)	25
3.1.2. Preparação dos bioCPs com o ligando ácido 4,4'-oxibis benzóico (H ₂ obba)	29
3.2. Produção de filmes derivados de agarose e fécula de batata	33
3.2.1. Produção de filmes de agarose.....	33
3.2.2. Produção de filmes de fécula de batata	33
3.3. Testes microbiológicos.....	36
3.4. Testes citotóxicos	36
4. Resultados e Discussão	41
4.1. Descrição estrutural e topológica	41
4.1.1 Descrição estrutural para os bioCPs 1-6.....	41
4.2. Análise de FTIR-ATR.....	47
4.3. Análises termogravimétricas dos bioCPs	50
4.4. Testes microbiológicos.....	52
4.4.1. Filmes de agarose	53

4.4.2. Filmes de fécula de batata	57
4.5. Testes citotóxicos	62
5. Conclusões e Perspetivas Futuras	65
6. Referências Bibliográficas	67
7. Anexos	72

Índice de Figuras

Figura 1 – Produção de biofilme.....	3
Figura 2 - Camadas de contorno de bactérias Gram-positivas.....	4
Figura 3 - Camadas de contorno de bactérias Gram-negativas.....	5
Figura 4 - Síntese de MOFs com um grande número resultante de diferentes estruturas (polimorfismo).	9
Figura 5 - Fórmulas estruturais dos ligandos utilizados: a) H ₂ sdba: ácido-4,4'-sulfonildibenzoico; b) H ₂ obba: ácido-4,4'-oxibis benzoico.....	12
Figura 6 - Mecanismos específicos antimicrobianos para os metais prata(I) (Ag), zinco(II) (Zn), cobre(II) (Cu) e cobalto(II) (Co).	14
Figura 7 - Proposição de mecanismo de ação de um MOF sobre uma bactéria.....	14
Figura 8 - Estrutura química da agarose.	15
Figura 9 - Estruturas químicas: a) Amilose; b) Amilopectina.....	16
Figura 10 - Esquema geral das sínteses realizadas na formação de bioCPs.	24
Figura 11 – Esquema reacional para obtenção do bioCP 1.....	26
Figura 12 – Esquema reacional para obtenção do bioCP 2.....	27
Figura 13 – Esquema reacional para obtenção do bioCP 3.....	28
Figura 14 – Esquema reacional para obtenção do bioCP 4.....	29
Figura 15 – Esquema reacional para obtenção dos bioCPs 5a e 5b.	31
Figura 16 - Reação entre o ligando ácido 4,4'-oxibis benzoico e o cloreto de zinco(II).....	32
Figura 17 - Cristais sintetizados com respetiva legenda.....	32
Figura 18 - Preparação de filme de agarose dopado.....	33
Figura 19 - Preparação de filme de fécula de batata dopado.	34
Figura 20 – Filmes produzidos: a) filme de agarose puro (branco); b) filme de fécula de batata puro (branco).	34
Figura 21 - Discos de agarose do filme branco e dos filmes dopados com bioCPs 1, 2, 3, 4, 5a, 5b e 6. Discos dopados com cada bioCP com as concentrações de 1%; 2,5% e 5%, pela respetiva ordem.	35
Figura 22 - Discos de fécula de batata do filme branco e dos filmes dopados com bioCPs 1, 2, 3, 4, 5a, 5b e 6. Discos dopados com cada bioCP com as concentrações de 1%; 2,5% e 5%, pela respetiva ordem.....	35
Figura 23 - Captação de células HepG2 através de microscópio. Zoom x200.....	37
Figura 24 - Teste aos bioCPs isolados por: a) método de contacto direto; b) método de lixiviação.	37
Figura 25 – (a) Representação da estrutura cristalina do bioCP 1, {Ag ₂ (μ ₄ -sdba)} _n . (b) Representação da estrutura cristalina 2D do bioCP 1. Alguns átomos foram omitidos para	

maior clareza. Os elipsoides térmicos foram representados com o nível de probabilidade de 50%. Código de simetria: $i(-x, 1-y, 1-z)$, $ii(1+x, \frac{1}{2}-y, z)$ e $iii(-x, -1/2+y, 1-z)$	41
Figura 26 - (a) Representação das cadeias 1D formadas pelos iões Cu(II) e pelos ligandos $sdba^{2-}$. (b) Representação da estrutura cristalina 2D do bioCP 2. Alguns átomos foram omitidos para maior clareza. Os elipsoides térmicos com probabilidade de 50%. Código de simetria: $i(1-x, y, 2-z)$, $ii(1-x, 1-y, 2-z)$	42
Figura 27 - (a) Representação das cadeias 1D formadas pelos iões Ag^+ e pelos ligandos $obba^{2-}$. (b) Uma vista da rede 2D do bioCP 4. Alguns átomos foram omitidos para maior clareza. Os elipsoides térmicos com probabilidade de 50%. Código de simetria: $i(x, -1+y, z)$, $ii(1-x, -y, 1-z)$, $iii(x, 1+y, z)$, $iv(1-x, y, \frac{1}{2}-z)$	42
Figura 28 - (a) Representação da estrutura cristalina do bioCP 5a, $\{Cu_2(obba)(NH_3)(OH)\}_n$ bem como o ambiente de coordenação dos iões Cu(II). (b) Apresentação da estrutura 3D do bioCP 5a. Os elipsoides térmicos foram representados com 50%. Alguns átomos são omitidos para maior clareza. Código de simetria: $i(\frac{1}{2}-X, -\frac{1}{2}+y, \frac{1}{2}-z)$, $ii(1-x, 1-y, 1-z)$	43
Figura 29 - (a) Ambiente de coordenação dos iões Cu(II) no bioCP 5b, $\{Cu(OBBA)_{0.5}(NH_3)\}_n$. (b) Estrutura das cadeias 1D onduladas no bioCP 5b. Os elipsoides térmicos foram representados com 50% de probabilidade e alguns átomos foram omitidos. Código de simetria: $i(3/2-x, \frac{1}{2}-y, 1-z)$ e $ii(1-x, y, 3/2-z)$	44
Figura 30 - (a) Representação da estrutura do bioCP 6, $\{Zn(\mu-obba)(NH_3)_2\}_n$. (b) Cadeias 1D formadas pela coordenação em ponte com os grupos carboxilatos do ligando. Código de simetria: $i(1+x, y, 1+z)$. Os elipsoides térmicos foram representados com 50% de probabilidade.	44
Figura 31 - Dados de difração de raios X de policristais para os bioCPs 1 e 2 em (a) e (b), respectivamente. Código de cor: Linhas Pretas = Dados experimentais, linhas vermelhas = Dados simulados a partir da estrutura cristalina.	45
Figura 32 - Dados de difração de raios X de policristais para o bioCP 4. Código de cor: Linhas Pretas = Dados experimentais, linhas vermelhas = Dados simulados a partir da estrutura cristalina.....	45
Figura 33 - Dados de difração de raios X de policristais para os bioCPs 5a e 5b em (a) e (b), respectivamente. Código de cor: Linhas Pretas = Dados experimentais, linhas vermelhas = Dados simulados a partir da estrutura cristalina.	46
Figura 34 - Dados de difração de raios X de policristais para o bioCP 6. Código de cor: Linhas Pretas = Dados experimentais, linhas vermelhas = Dados simulados a partir da estrutura cristalina.....	46
Figura 35 - Dados de difração de raios X de policristais para os bioCPs 3. Código de cor: Linhas Pretas = Dados experimentais, linhas vermelhas = Dados simulados a partir da estrutura cristalina.....	47
Figura 36 - Espetros de FTIR-ATR para o ligando H_2sdba e para os bioCPs 1, 2 e 3.....	48

Figura 37 - Espectros de FTIR-ATR para o ligando H2obba e para os bioCPs 4, 5a, 5b e 6.....	49
Figura 38 - Termograma (TGA) dos CPs 1 e 2.....	51
Figura 39 – Termogramas de agarose@branco, agarose@(1) 5,0% e agarose@(2) 5,0%.....	51
Figura 40 – Termogramas de fécula@branco, fécula@(1) 0,5% e fécula@(2) 0,5%.....	52
Figura 41 - Halos de inibição obtidos para os filmes agarose@(5a) 1,0%, agarose@(4) 1,0%, agarose@(4) 5,0% e agarose@Cu(NO ₃) ₂ 2,5%.....	53
Figura 42 – Atividade antibacteriana de <i>E. coli</i> normalizada de filmes de biopolímero de agarose dopados com os ligandos e metais utilizados para a síntese dos bioCPs em estudo em diferentes percentagens (1, 2.5 e 5%).....	54
Figura 43 – Atividade antibacteriana de <i>S. aureus</i> normalizada de filmes de biopolímero de agarose dopados com os ligandos e metais utilizados para a síntese dos bioCPs em estudo em diferentes percentagens (1, 2.5 e 5%).....	54
Figura 44 – Atividade antibacteriana de <i>E. coli</i> normalizada de filmes de biopolímero de agarose dopados com bioCPs em estudo em diferentes percentagens (1, 2.5 e 5%).....	55
Figura 45 - Atividade antibacteriana de <i>S. aureus</i> normalizada de filmes de biopolímero de agarose dopados com bioCPs em estudo em diferentes percentagens (1, 2.5 e 5%).....	56
Figura 46 – Atividade antibacteriana de <i>E. coli</i> normalizada de filmes de biopolímero de fécula de batata dopados com os ligandos e metais utilizados para a síntese dos bioCPs em estudo em diferentes percentagens (0.10, 0.25 e 0.50%).....	58
Figura 47 – Atividade antibacteriana de <i>S. aureus</i> normalizada de filmes de biopolímero de fécula de batata dopados com os ligandos e metais utilizados para a síntese dos bioCPs em estudo em diferentes percentagens (0.10, 0.25 e 0.50%).....	58
Figura 48 – Atividade antibacteriana de <i>E. coli</i> normalizada de filmes de biopolímero de fécula de batata dopados com bioCPs em estudo em diferentes percentagens (0.10, 0.25 e 0.50%).....	59
Figura 49 - Atividade antibacteriana de <i>S. aureus</i> normalizada de filmes de biopolímero de fécula de batata dopados com bioCPs em estudo em diferentes percentagens (0.10, 0.25 e 0.50%).....	60
Figura 50 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 1, para o filme de agarose branco e para o filme de agarose dopado com o bioCP 1 (5%).....	76
Figura 51 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 2, para o filme de agarose branco e para o filme de agarose dopado com o bioCP 2 (5%).....	76
Figura 52 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 3, para o filme de agarose branco e para o filme de agarose dopado com o bioCP 3 (5%).....	77
Figura 53 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 4, para o filme de agarose branco e para o filme de agarose dopado com o bioCP 4 (5%).....	77
Figura 54 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 5a, para o filme de agarose branco e para o filme de agarose dopado com o bioCP 5a (5%).....	78

Figura 55 - Espetros de FTIR-ATR para o bioCP 5b, para o filme de agarose branco e para o filme de agarose dopado com o bioCP 5b (5%).	78
Figura 56 - Espetros de FTIR-ATR para o bioCP 6, para o filme de agarose branco e para o filme de agarose dopado com o bioCP 6 (5%).	79
Figura 57 - Espetros de FTIR-ATR para o bioCP 1, para o filme de fécula branco e para o filme de fécula dopado com o bioCP 1 (0,5%).	79
Figura 58 - Espetros de FTIR-ATR para o bioCP 2, para o filme de fécula branco e para o filme de fécula dopado com o bioCP 2 (0,5%).	80
Figura 59 - Espetros de FTIR-ATR para o bioCP 3, para o filme de fécula branco e para o filme de fécula dopado com o bioCP 3 (0,5%).	80
Figura 60 - Espetros de FTIR-ATR para o bioCP 4, para o filme de fécula branco e para o filme de fécula dopado com o bioCP 4 (0,5%).	81
Figura 61 - Espetros de FTIR-ATR para o bioCP 5a, para o filme de fécula branco e para o filme de fécula dopado com o bioCP 5a (0,5%).	81
Figura 62 - Espetros de FTIR-ATR para o bioCP 5b, para o filme de fécula branco e para o filme de fécula dopado com o bioCP 5b (0,5%).	82
Figura 63 - Espetros de FTIR-ATR para o bioCP 6, para o filme de fécula branco e para o filme de fécula dopado com o bioCP 6 (0,5%).	82

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Referências dos polímeros de coordenação sintetizados, metais e respectivos ligandos utilizados para a síntese.....	25
Tabela 2 - Valores de citotoxicidade obtidos para cada ensaio do bioCP 1.....	62
Tabela 3 - Valores de citotoxicidade obtidos para cada ensaio do bioCP 2.....	63
Tabela 4 - Massas de bioCPs utilizadas para a produção de cada Filme de agarose e respectiva percentagem de dopagem.	72
Tabela 5- Massas de bioCPs (polímeros de coordenação) utilizadas para a produção de cada filme de amido de batata e respectiva percentagem de dopagem.....	73
Tabela 6 - Halos de inibição obtidos nos testes microbiológicos para as bactérias Escherichia coli e Staphylococcus aureus, em filmes de agarose.	74
Tabela 7 - Halos de inibição obtidos nos testes microbiológicos para as bactérias Escherichia coli e Staphylococcus aureus, em filmes de amido de batata.....	75

Abreviaturas e Siglas

1D	Uma Dimensão
2D	Duas Dimensões
3D	Três Dimensões
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATR	Refletância Total Atenuada
CPs	Polímero de Coordenação
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FBS	Soro Fetal Bovino
FTIR	Infravermelho por Transformada de Fourier
H₂obba	Ácido - 4,4'-oxibis benzoico
H₂sdba	Ácido - 4,4'-sulfonildibenzóico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IV	Infravermelho
LDH	Lactato Desidrogenase
MOFs	Rede Metal-Orgânica
PBPs	Proteínas de Ligação de Penicilina
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TGA	Análise Termogravimétrica

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Biofilmes

Os microrganismos, incluindo as bactérias, desenvolvem-se naturalmente em grupos, estabelecendo aglomerados complexos e dinâmicos designados de biofilmes. A capacidade dos microrganismos em persistir e prosperar dentro dos filmes é uma particularidade que requer uma preocupação crítica, sobretudo quando podem desenvolver-se em ambientes clínicos ou hospitalares. De facto, os biofilmes desempenham um papel muito significativo na sobrevivência e persistência microbiana em ecossistemas naturais, sendo, portanto, omnipresentes na natureza e considerados como uma forma antiga de adaptação microbiana. Notavelmente, especula-se que a transição dos microrganismos para o modo de crescimento em filme estabeleceu a primeira forma de vida multicelular como uma resposta adaptativa às condições extremas encontradas na Terra primitiva.^[1] Os biofilmes são geralmente caracterizados como estruturas bem organizadas de microrganismos aderidos a superfícies bióticas ou abióticas e cujas células são envoltas e protegidas por uma matriz polimérica autoproduzida. Normalmente, o ciclo de vida do biofilme abrange três estágios, (i) fixação, (ii) maturação e (iii) dispersão. A primeira fase inicia-se pela ligação reversível das bactérias a uma superfície seguida pela sua ligação irreversível. Em seguida, ocorre o crescimento bacteriano e a produção de matriz, levando ao aumento da biomassa e maturação do biofilme. Nesta fase, os biofilmes desenvolvem microambientes dependentes de gradientes de nutrientes e do oxigénio, com células desenvolvendo diferentes fenótipos dependendo da sua organização espacial. Finalmente, os biofilmes acabam por se dispersar, permitindo às células migrarem e colonizarem outras áreas (Figura 1).^[1]



Figura 1 – Produção de biofilme.

1.2. Bactérias

A crescente resistência das bactérias aos antibióticos tornou-se um problema de saúde pública. Nas últimas décadas, a resistência contra organismos Gram-positivos, como *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus*, resistentes à vancomicina, e *Streptococcus* resistente à penicilina aos macrolídeos e às fluoroquinolonas; organismos Gram-negativos, como a

Escherichia coli, que é resistente à tetraciclina, estreptomicina, sulfonamidas, ampicilina e canamicina, levou à procura de novos mecanismos de inibição da atividade bacteriana. [2]

1.2.1. Bactérias Gram-positivas

As bactérias Gram-positivas contêm uma espessa camada de peptidoglicano a qual fornece uma barreira física, protegendo o microrganismo do ambiente além de ser responsável por fixar polímeros como ácido teicóico, lipoteicóico e proteínas de superfície (Figura 2). [3][4]

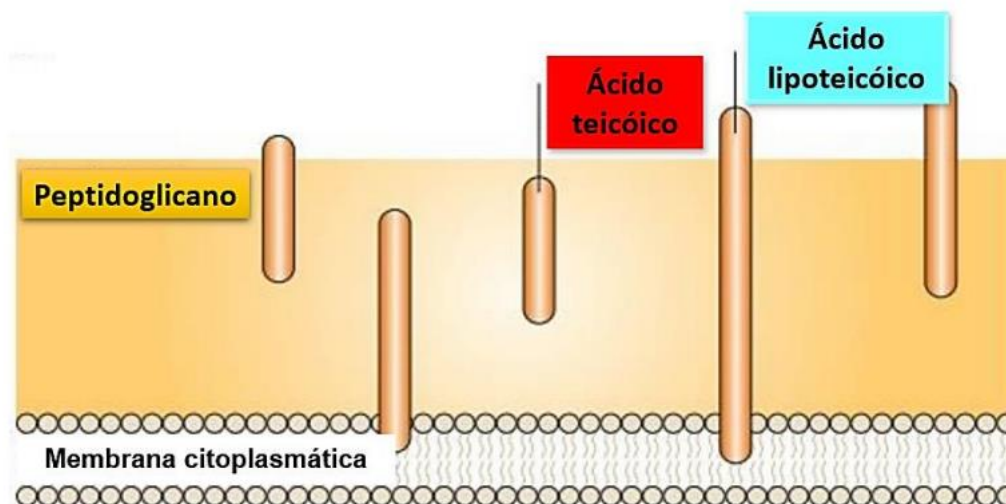


Figura 2 - Camadas de contorno de bactérias Gram-positivas. [3]

A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria associada ao ser humano e outros animais, é comensal, mas pode ser patogénica, oportunista e versátil, capaz de ocasionar várias doenças, entre as principais: síndrome do choque tóxico, bacteremia, endocardites, infeções metastáticas e sepses. [5] São cocos da família *Staphylococcaceae* e são caracterizadas principalmente por apresentarem parede de estrutura Gram-positiva, realizarem fermentação do manitol e produzirem enzimas como a catalase e a coagulase. [6]

Em humanos, o seu *habitat* primário é o trato respiratório superior, particularmente o epitélio que recobre(II) as fossas nasais, como também pode ser encontrado noutros locais como o trato gastrointestinal. É importante mencionar que a taxa de infeção aumenta consideravelmente em pacientes internados e profissionais de saúde. De acordo com os últimos registos na literatura, a *S. aureus* tem vindo a ganhar resistência contra agentes antimicrobianos, devido à sua capacidade de sobrevivência e multiplicação numa diversidade de ambientes. [7][8]

Em 1944, ocorreu a introdução da penicilina que ofereceu uma oportunidade de tratamento de infeções estafilocócicas severas. O mecanismo de ação da penicilina deve-se à inibição de

proteínas de ligação (PBPs - *Penicilin Binding Proteins*) da bactéria, que tem alta afinidade com antibióticos β -lactâmicos, atuando nas etapas finais da formação da parede celular das bactérias (ligações cruzadas do peptidoglicano). No mesmo ano em que o sucesso clínico no tratamento com penicilina foi reportado, seria descrita também uma enzima produzida pela *S. aureus*, a penicilinase, hoje denominada como β -lactamase, produto do gene *blaZ*, que apresenta atividade proteolítica, quebrando o anel β -lactâmico dos antibióticos do grupo das penicilinas. [9][10]

1.2.2. Bactérias Gram-negativas

A membrana exterior das bactérias Gram-negativas possui uma organização complexa. Contém uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa que integra os lipopolissacarídeos (Figura 3). As lipoproteínas são responsáveis por ligarem a membrana externa à camada de peptidoglicano que está localizada entre o espaço periplasmático, formado entre a membrana externa e a membrana citoplasmática. [3] O peptidoglicano é formado de aminoácidos e hidratos de carbono de unidades repetidas. Assim, os antibióticos que possuem os grupos ácido carboxílico e amino nas suas fórmulas estruturais podem interagir com a membrana das bactérias Gram-negativas. [11]

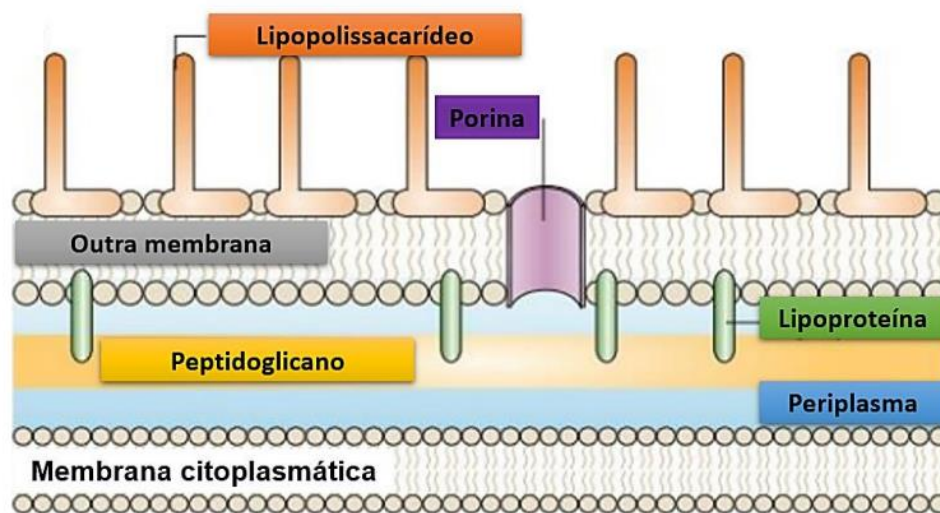


Figura 3 - Camadas de contorno de bactérias Gram-negativas. [3]

A parede celular das bactérias Gram-negativas por consistirem em lípidos, proteínas e lipopolissacarídeos, fornecem uma proteção eficaz contra biocidas. [12]

A *Escherichia coli* é uma bactéria em forma de bastonete, com cerca de 0,5 μm de diâmetro de base por 2,0 μm de comprimento. É uma bactéria Gram-negativa comumente presente no intestino dos animais, inclusive do Homem, e desempenha um efeito benéfico sobre o organismo, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando uma

considerável quantidade de vitaminas. Porém, dentro das diversas estirpes de *E. coli*, existe um grupo capaz de provocar doenças nos seres humanos, que são coletivamente chamadas de *E. coli* patogénicas. Existem seis grupos conhecidos de *E. coli* capazes de gerar gastroenterites em humanos: as enteropatogénicas, as enterotoxigénicas, as enteroinvasivas, as enterohemorrágicas, as enteroagregativas e as difuso-aderentes. ^[12]

As estirpes de *E. coli* demonstram grande capacidade de aquisição de genes de resistência, e os seus estudos apontam para uma proporção bastante significativa (de 40 a 90%) das estirpes resistentes à ampicilina, estreptomicina, tetraciclina e sulfamidas, e uma proporção de 15 a 30% das estirpes resistentes a cefalosporinas de primeira geração, neomicina, canamicina, cloranfenicol, nitrofurantoína e quinolonas. ^[12]

1.3. A necessidade de novos agentes antibacterianos

Os biomateriais usados em medicina para construir dispositivos médicos e próteses, sofrem cada vez mais contaminações devido a filmes produzidos por bactérias, o que leva ao aumento de infeções bacterianas nos hospitais. ^[13] O maior número de contaminações está também relacionado com a resistência que as bactérias podem desenvolver, por meio de vários mecanismos diferentes, incluindo alteração do sítio alvo ou da via metabólica de um antibiótico, redução da acumulação de fármaco numa célula ou a sua inativação. ^[14]

É de notar que os antibióticos são agentes antibacterianos produzidos por microrganismos (como alguns fungos), os quimioterápicos são agentes antibacterianos produzidos sinteticamente. ^[15]

A fabricação de novos materiais que podem ser usados para fins profiláticos, como o tratamento de superfícies de ferramentas cirúrgicas e dispositivos médicos implantados, bem como superfícies de contacto diário em áreas comuns (com por exemplo, mesas, cadeiras com encosto alto, maçanetas, interruptores de luz), pode ser uma estratégia eficaz para prevenir o crescimento de filmes e, conseqüentemente, a disseminação de infeções resistentes aos antibióticos. ^{[16][17]}

Sistemas de nanopartículas de metal/óxido-metálico, bem como redes organometálicas, conhecidas como Redes Metal-Orgânicas (MOFs), têm vindo a demonstrar atividade antibacteriana significativa através da libertação de *building-blocks* bactericidas, tais como iões metálicos ou mesmo componentes orgânicos da estrutura ou adsorvidos (*drug delivery*), para além de terem outras aplicações significativas, como o armazenamento e separação de gases e a catálise heterogénea. Os mecanismos de ação destes materiais são totalmente diferentes dos mecanismos de ação dos antibióticos. Tais sistemas podem fornecer uma alternativa às

estratégias antibacterianas atuais e podem tornar-se uma nova solução para o problema da resistência a fármacos. [18]

1.4. Polímeros de coordenação

Polímeros de coordenação (CPs) são compostos constituídos por uma componente orgânica – o ligando, por um bloco de construção metálico – íons metálicos, e se for biodisponível ou com atividade biológica pode-se designar por bioCP. As ligações covalentes e não covalentes, como *Van der Waals*, são importantes na construção destas arquiteturas moleculares estendidas. [19] [20]

Quando a estrutura formada com polímeros de coordenação apresenta poros, esta pode ser classificada como uma Rede Metal-Orgânica (ou *Metal Organic Framework* - MOF), e estes podem estender-se infinitamente em uma, duas ou três dimensões (1D, 2D ou 3D), sendo que os poros podem ser obtidos variando-se as condições do sistema, tais como, temperatura e pressão. [25][26] [27]

Os polímeros de coordenação representam um novo tipo de materiais híbridos orgânicos-inorgânicos, que estão associados a um enorme potencial para as mais diversas aplicações, desde a área da catálise, à libertação de fármacos, ao magnetismo, à fluorescência, detecção, adsorção de poluentes, e às aplicações antibacterianas, e a maior parte destas aplicações são devido à presença de sítios ativos, estruturas prontamente adaptadas e com várias composições. [21][22] Notavelmente, os bioCPs utilizados para inibição do desenvolvimento de microrganismos despertaram um grande interesse na comunidade científica, alguns dos quais foram sintetizados e investigados, tendo aplicações como agentes antifúngicos, antivirais, antitumorais e antibacterianos. [23][24]

1.4.1. Síntese

A formação destes materiais consiste num processo de automontagem a partir das espécies presentes no meio reacional para a formação do produto mais termodinamicamente favorável. Sendo assim, a estrutura preferencial do MOF obtido com sucesso dependerá de um conjunto de fatores: escolha dos precursores metálicos, pH (maioritariamente ácido), concentração (que varia numa larga gama), razão molar metal:ligando, tempo de reação, natureza do precursor metálico, natureza do ligando, uso de moduladores de coordenação, temperatura, entre outras condições experimentais de síntese. [28]

Com relação às rotas sintéticas utilizadas para a obtenção dos MOFs, podem ser classificadas em convencionais e não convencionais. Os métodos convencionais envolvem desde a simples mistura do sal metálico com o ligando e o solvente, passando por reações

envolvendo a difusão dos reagentes; até à síntese hidrotérmica. [29] As sínteses hidrotérmicas consistem em colocar a mistura reacional num reator (geralmente de aço revestido internamente com *Teflon*), que é aquecido a temperaturas superiores ao ponto de ebulição do solvente; desta maneira, a síntese é levada a condições de pressão adequadas, podendo ser com ou sem agitação. Variações nas rampas de aquecimento ou arrefecimento promovem o crescimento dos cristais. O tempo de preparação dos MOFs por este método é longo, podendo variar de algumas horas até vários dias. A grande vantagem desse método dá-se pela possibilidade de formação, nessas condições, de monocristais de tamanho superior a 100 μm . [28]

Por outro lado, os métodos não convencionais, como as sínteses assistidas por micro-ondas, mecanoquímica e sonoquímica, são métodos alternativos que visam uma maior compatibilidade do ponto de vista ambiental, pois diminuem consideravelmente o uso de solvente e os tempos de reação, levando conseqüentemente à produção de cristais pequenos. [30][31]

Os blocos de construção de MOFs podem ser mantidos juntos por vários tipos de ligação que incluem coordenação de metal, pontes de hidrogénio, interações eletrostáticas e empilhamento π - π . Esta é uma das razões pelas quais a estrutura de um MOF pode ser facilmente adaptada para atingir as características necessárias para uma aplicação escolhida. [32]

Em comparação com alguns materiais tradicionais, como materiais zeolíticos porosos e polímeros, os MOFs possuem uma área de superfície e volume específicos, tamanho de poro ajustável e melhor biocompatibilidade, o que os torna candidatos ideais para utilização em aplicações antimicrobianas. Além disso, a porosidade e composição dos MOFs pode ser ajustada cuidadosamente escolhendo componentes orgânicos e iões metálicos específicos para alcançar as características físico-químicas pretendidas. [26]

A natureza do solvente, do ligando, e da presença de catiões ou outras moléculas na síntese, pode ter um efeito dramático na estrutura cristalina do bioCP obtido. Assim, uma combinação específica metal-ligando pode conduzir a um grande número de diferentes estruturas (polimorfismo), que dependem de pequenas mudanças nos supramencionados parâmetros de síntese (Figura 4). [33]

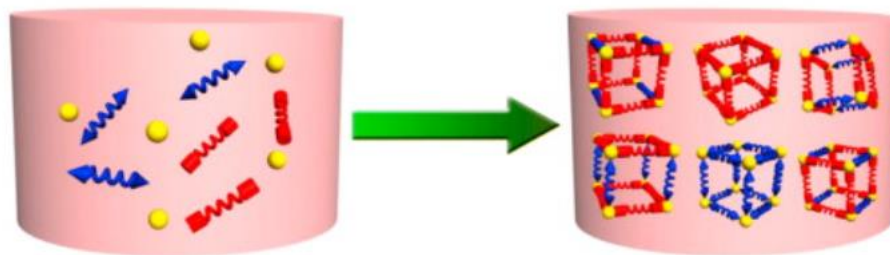


Figura 4 - Síntese de MOFs com um grande número resultante de diferentes estruturas (polimorfismo).

Na síntese de bioMOFs geralmente sais solúveis atuam como fonte de centro metálico (Zn^{2+} , Ag^+ , Co^{2+} , Cu^{2+} , e Mo^{6+}), e ligandos azo atuam como ligandos orgânicos. [26]

1.4.2. Metais

O uso antimicrobiano de metais como prata(I), ouro(I), cobalto(II), cobre(II) e zinco(II) é reconhecido desde a antiguidade. Recentemente, o campo da nanotecnologia incorporou esses metais em sistemas nanoestruturados para formas de dosagem melhoradas e efeitos terapêuticos. A atividade antibacteriana de nanomateriais é de amplo espectro e inclui danos físicos às células bacterianas, ao contrário dos antibióticos convencionais. [34]

Os MOFs têm a capacidade de incorporar praticamente todo o tipo de cátions sejam eles di, tri, ou tetravalentes, e uma grande variedade de metais no seu estado estacionário de oxidação – alcalinos, alcalinoterrosos, metais de transição, e elementos raros. [33]

Os centros metálicos nos MOFs são encapsulados por ligandos orgânicos e distribuídos uniformemente em toda a estrutura, permitindo a liberação lenta, controlada e sustentada das espécies metálicas, de forma a diminuir a potencial toxicidade causada pela liberação repentina de íons metálicos. [35]

As propriedades antibacterianas geralmente originam-se dos metais na forma catiónica, tendo as estruturas a atuar como reservatórios de íons metálicos. [34]

No trabalho desenvolvido deu-se especificamente atenção aos íons metálicos de Cobre(II) (Cu^{2+}), Prata(I) (Ag^+) e Zinco(II) (Zn^{2+}).

Cobre

Compostos de coordenação de cobre(II) são de interesse significativo devido ao seu papel vital em sistemas medicinais-químicos e biológicos com foco na fisiologia molecular do transporte de íons de cobre(II).^[36]

Comparado com fármacos, os bioMOFs de cobre(II) podem aumentar as atividades antiulcerogênicas e anti-inflamatórias, bem como reduzir a toxicidade gastrointestinal. Muitos estudos de complexos de cobre(II) também se concentraram nas potenciais propriedades quimioterapêuticas, além disso, muitos autores prestaram atenção à atividade antibacteriana e antiviral de bioMOFs à base de cobre(II), tendo revelado capacidade de desativar vírus tais como Influenza A, H1N1 e HIV.^[36]

É de notar que os bioMOFs de cobre(II) têm forte capacidade de ligação com os átomos de azoto e oxigênio.^[1]

Prata

Devido à alta afinidade da prata(I) com biomoléculas contendo azoto e enxofre extracelulares e intracelulares, como ácidos nucleicos e proteínas, as atividades celulares comuns, como divisão celular e respiração, seriam afetadas, o que eventualmente causa a morte de algumas bactérias. As nanoestruturas de íons Ag^+ apresentam uma eficiência antibacteriana dependente do seu tamanho. Quanto menor a nanopartícula de Ag^+ , maior a eficiência antibacteriana.^[37]

Os agentes antibacterianos baseados em prata(I) têm características de longa ação contra bactérias, com alta estabilidade, amplo espectro antibacteriano, baixa volatilidade e baixa tendência a induzir resistência bacteriana.^{[38][39]}

Zinco

Notavelmente, dentro dos metais de transição, o zinco é um metal de transição de baixo custo endógeno^[34], e é um dos íons metálicos biológicos mais amplamente utilizados do ponto de vista da atividade antibacteriana.^[25]

Estudos demonstraram que nanopartículas de ZnO têm eficaz atividade antibacteriana em algumas bactérias, danificando a membrana celular por meio de internalização celular. No entanto estas partículas requerem um agente de passivação para evitar a sua agregação, o que pode ser prejudicial para a atividade antibacteriana. Portanto, um material que forneça liberação estequiométrica de íons metálicos de zinco(II) sem agregação seria uma plataforma ideal para materiais com atividade antibacteriana.^[34]

1.4.3. Ligandos

Tanto os iões que residem nos poros quanto os ligandos orgânicos podem contribuir para a atividade antibacteriana. [34]

A escolha dos ligandos é sobretudo baseada no seu núcleo e inclui elementos como moléculas aromáticas policarboxílicas, bipyridinas e poliazaheterociclos (imidazóis, triazóis, tetrazóis, pirimidinas, pirazinas) e seus derivados. [33]

A intensa atividade de investigação na direção do *design* racional e construção de CPs ou MOFs com ligandos mistos tem mostrado que os ligandos bicíclicos e policarboxílicos representam os blocos de construção mais confiáveis e típicos que podem ser aplicados conjuntamente para sintetizar uma ampla gama de redes de coordenação desejadas. [40]

Ácidos di- e policarboxílicos flexíveis são bons candidatos para a construção de novos compostos metal-orgânicos, pois os grupos carboxilos podem formar anéis de quatro membros C–O–M–O com iões metálicos centrais, melhorando assim a estabilidade do metal na estrutura do MOF. Além disso, ácidos di- e policarboxílicos possuem dois ou mais grupos carboxilos que podem ser completamente ou parcialmente desprotonados, o que resulta numa rica variedade de modos de coordenação e muitas estruturas interessantes com dimensões maiores.

Ligandos policarboxílicos formam múltiplas ligações de hidrogénio. As ligações de hidrogénio ainda são o meio mais confiável e amplamente utilizado para a imposição de reconhecimento molecular. Além dessas ligações de hidrogénio convencionais fortes, vários tipos de interações intermoleculares não convencionais (carbonilo... π , π ... π e anião... π) também foram encontradas para serem instrumentais na determinação das estruturas supramoleculares de sólidos. No entanto, os aglomerados de água podem desempenhar papéis importantes na estabilização de sistemas supramoleculares, especialmente em ambientes policarboxílicos. [41]

Ligandos mais longos proporcionam cavidades maiores na estrutura, e de forma geral pode-se dizer que quanto maiores as cavidades numa rede 3D, mais provável é a ocorrência de interpenetração. [41]

Ligandos em forma de V desempenham um papel importante na formação de cadeias helicoidais, tal como ligandos flexíveis e longos, o que resulta numa alta estabilidade estrutural e quiralidade dos materiais em massa. [41]

1.4.3.1. Ácido 4,4'-sulfonildibenzóico (H₂sdba)

O ácido 4,4'-sulfonildibenzóico (H₂sdba) é um exemplo típico de um ligando dicarboxílico (Figura 5a).

Uma característica particular do deste ligando é o número de modos de coordenação que este pode exibir, pois possui seis potenciais átomos doadores que permitem a formação de estruturas variáveis com diferentes topologias e dimensões construídas em diferentes direções. No entanto, a química de coordenação e as propriedades estruturais de polímeros metálicos contendo este ligando raramente foram documentadas até o momento. [42]

1.4.3.2. Ácido 4,4'-oxibis benzoico (H₂obba)

De acordo com a literatura, os polímeros de coordenação formados com o ligando orgânico de ponte exo-bidentado em forma de V e flexível, designado por ácido 4,4'-oxibis benzoico (H₂obba), têm sido amplamente estudados devido a sua rica modalidade de coordenação. (Figura 5b). [43]

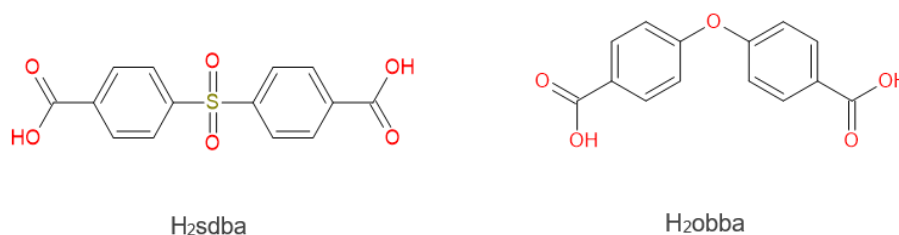


Figura 5 - Fórmulas estruturais dos ligandos utilizados: a) H₂sdba: ácido-4,4'-sulfonildibenzóico; b) H₂obba: ácido-4,4'-oxibis benzoico.

1.5.4 Aplicações antibacterianas

Os bioMOFs têm várias potenciais vantagens sobre os nanomedicamentos convencionais, com diversidade estrutural e química, alta capacidade de carga e biodegradabilidade. [26]

Estes compostos ao revelarem múltiplos mecanismos de ação antibacteriana, cumprem a hipótese de tornarem o desenvolvimento de resistência mais improvável. A resistência bacteriana a fármacos é o resultado da aquisição, por bactérias, de genes que conferem resistência a fármacos singulares, subsequente expressão desses genes e sua transferência por transformação, conjugação e transdução entre outras células bacterianas. A resistência a múltiplos fármacos é desenvolvida quando uma célula bacteriana que já contém um gene de resistência recebe outro contra um fármaco diferente. [26]

O desenvolvimento da resistência antibacteriana resulta na necessidade de aumentar a dosagem do medicamento antibacteriano, levando à intensificação dos efeitos adversos ou mesmo à falta de eficácia. Dado que a ação antibacteriana dos bioMOFs está associada a danos físicos das células bacterianas (e não a um processo metabólico específico, como nos antibióticos), que ocorre por meio de vários mecanismos, os bioMOFs são suportes ou alternativas promissoras para os antibióticos. Aqui, foca-se a atividade antibacteriana dos bioMOFs resultantes da presença de íons metálicos na sua estrutura. [26]

Os bioMOFs possuem componentes orgânicos e inorgânicos que contribuem para os efeitos antivirais e de esterilização, o que pode salvar a saúde humana relacionada à contaminação bacteriana. Em comparação com outros desinfetantes e agentes antibacterianos, os bioMOFs possuem vantagens críticas devido à sua alta durabilidade, persistência a longo prazo, eficácia crítica e estabilidade térmica e ótica. [44]

1.5.5 Modo de atuação dos bioMOFs

De uma forma geral, o mecanismo principal de ação é devido a (1): a alta condutividade elétrica do íon metálico e a eletricidade estática gerada tem uma forte afinidade por proteínas de enxofre, fazendo com que os íons metálicos adiram à membrana celular; (2): a aderência de íons metálicos pode aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática e levar à destruição da membrana celular; (3): quando os íons metálicos entram nas células, levam à inativação de enzimas e à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), estas espécies promovem ainda mais a rutura da membrana celular e a interrupção da replicação do DNA. [44][45][46]

Na Figura 6 encontra-se representado esquematicamente os mecanismos específicos antimicrobianos para os metais prata(I), zinco(II), cobre(II) e cobalto (II).

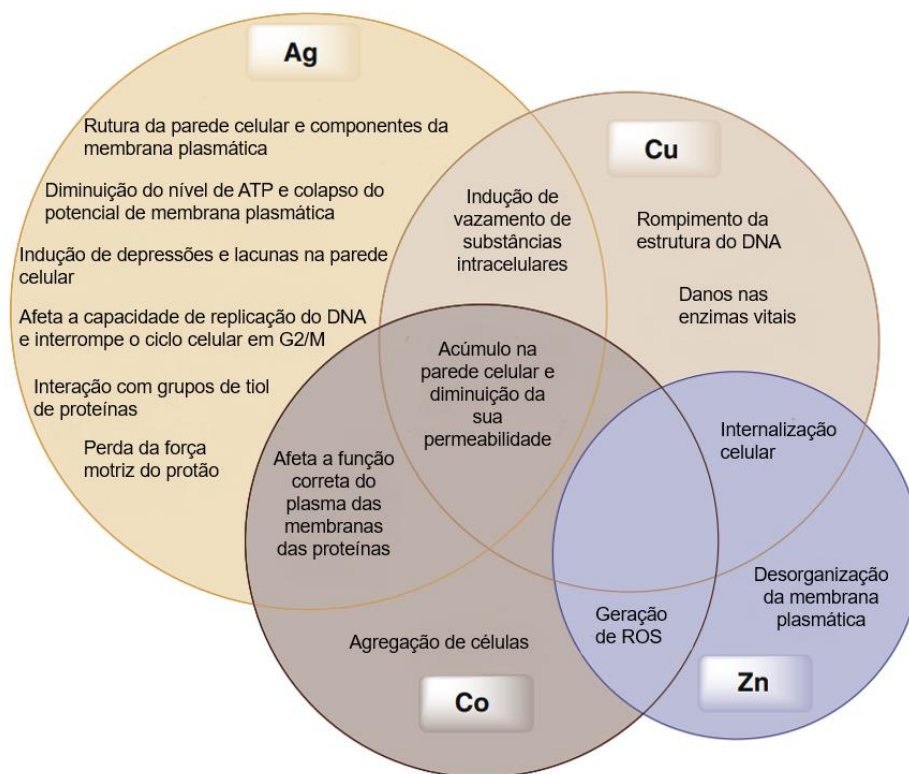


Figura 6 - Mecanismos específicos antimicrobianos para os metais prata(I) (Ag), zinco(II) (Zn), cobre(II) (Cu) e cobalto(II) (Co). [26]

Na Figura 7 pode-se visualizar o exemplo de uma proposição de mecanismo de ação de um bioMOF contra uma bactéria.

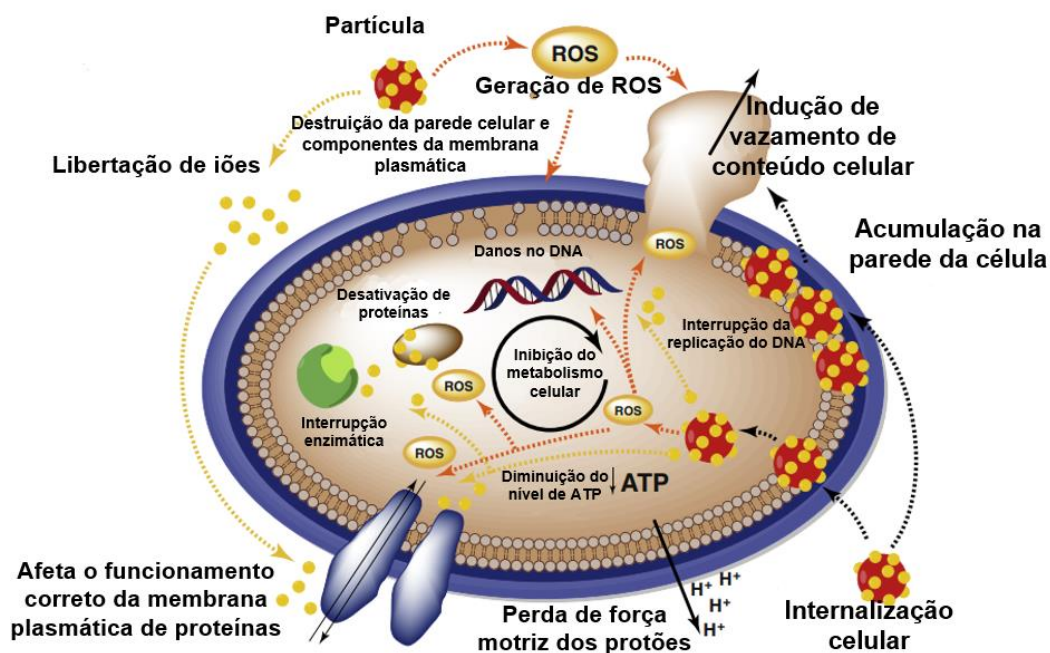


Figura 7 - Proposição de mecanismo de ação de um MOF sobre uma bactéria. [26]

1.6 Filmes biodegradáveis

Recentemente, existe uma considerável atenção focada na produção e revestimentos biodegradáveis devido às suas propriedades benéficas na preservação de alimentos e na mitigação de impactos ambientais. Biopolímeros, como polissacáridos e proteínas, são cada vez mais reconhecidos como opções viáveis para a produção de filmes e revestimentos [47], graças às suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade. [48] De forma geral, os polissacáridos apresentam a vantagem de serem biodegradáveis, não causarem danos à saúde e não libertarem substâncias tóxicas no meio ambiente. [49] A utilização de materiais híbridos destaca-se, sobretudo, na fabricação de sistemas de liberação controlada de princípios ativos. Essas vantagens estão intrinsecamente ligadas à liberação controlada e gradual da substância ativa, possibilitando a manutenção das concentrações libertadas de forma estável ao longo do tempo. [49]

1.6.1 Agarose

A agarose, é um polissacárido linear contendo unidades repetidas de β -D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose, na Figura 8, podemos observar a sua estrutura polimérica. As fortes ligações dos átomos de hidrogênio nos resíduos 3,6-anidro-L-galactose na agarose levam à formação de um gel com excelente poder gelificante. Este polissacárido pode formar um gel termoreversível e tem boa capacidade de formar filmes. [49]

A agarose é obtida a partir do agar, uma combinação de agarose e agarpectina, sendo este último extraído de algas marinhas vermelhas, como a *Gracilaria spp.* [50]. Amplamente utilizada como matriz para a imobilização de biomoléculas, como enzimas, anticorpos e antígenos, a agarose também é reconhecida por sua utilização convencional como gel em eletroforese na área de biologia molecular. Além disso, relatou-se a aplicação como agente de entrega de fármacos. Com a possibilidade de ser aplicada na fabricação de filmes, a agarose apresenta-se como uma alternativa viável para o desenvolvimento de novos materiais destinados a aplicações biomédicas, destacando-se por ser um polissacárido neutro e biodegradável. [50]

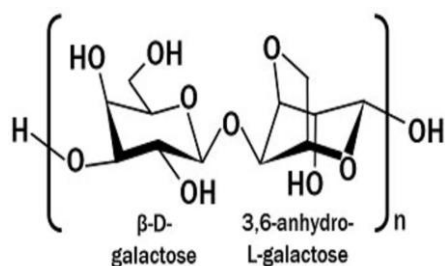


Figura 8 - Estrutura química da agarose.

No entanto, os filmes de agarose não podem atender aos requisitos operacionais devido à sua sensibilidade à água em comparação com materiais sintéticos tradicionais, de acordo com estudos. [48] Para superar as desvantagens, a agarose pode ser reforçada ao incorporá-la com outros polímeros. [48]

1.6.2 Fécula de batata

O amido da batata (também designado por fécula de batata) exibe boas propriedades de formação de filme, estabilidade química e também pode ser comestível. É produzido a partir de recursos básicos renováveis, baratos e biocompatíveis. [51]

Considerando o facto de o amido ser uma substância básica utilizada na produção de bioplástico, alguns estudos têm vindo a ser realizados sobre os métodos de preparação de amido termoplástico e o seu uso prospetivo. O amido é um polímero natural, renovável e sustentável isolado de muitas fontes botânicas potenciais, como trigo, milho, arroz, batata e tapioca, utilizando uma variedade de processos de separação e extração. Isto leva a classificar o amido como um dos materiais mais disponíveis e de baixo custo, de forma que poderá ter um amplo uso em aplicações alimentícias e não alimentícias. [52]

A fécula de batata é uma mistura de dois polissacáridos, amilose e amilopectina. As suas estruturas são ilustradas na Figura 9. A amilose é um α -glucano relativamente longo e linear com poucas ramificações, contendo aproximadamente 99% de ligações α -(1,4) e até 1% de ligações α -(1,6), enquanto a amilopectina é uma estrutura fortemente ramificada, contendo aproximadamente 95% ligações α -(1,4) e 5% ligações α -(1,6) numa estrutura hierárquica. [53]

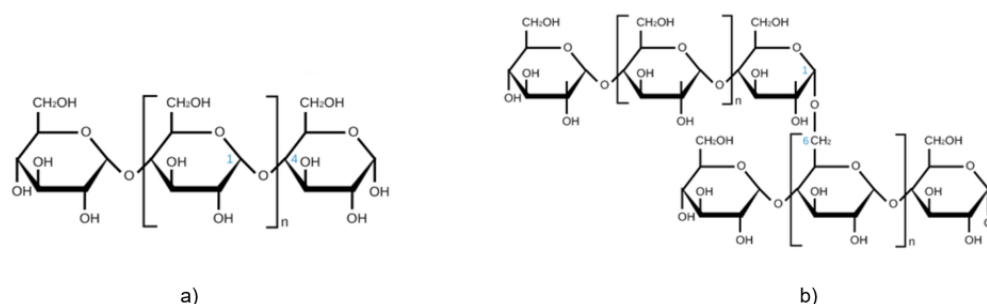


Figura 9 - Estruturas químicas: a) Amilose; b) Amilopectina.

O teor de amido nas batatas é de 13,5 a 15% com base no peso fresco, mas com base no peso seco é de aproximadamente 75 a 80%. [53]

Para a produção de filmes à base de fécula de batata é comum misturar o amido com um agente plastificante compatível. [52] Plastificantes são moléculas de baixo peso molecular e

baixa volatilidade, que reduzem as forças intermoleculares e aumentam a mobilidade das cadeias poliméricas. [51]

Os exemplos mais proeminentes de plastificantes individuais são: ureia, formamida, etilenebisformamida, N-(2-hidroxiethyl)formamida, ácido cítrico, glicerol, glucose, sorbitol e etilenoglicol. [54]

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

2. Considerações Gerais

Para a caracterização dos novos polímeros de coordenação e materiais de biopolímeros produzidos, recorreu-se a um conjunto de técnicas espectroscópicas convencionais, e de espectrometria. Todos os reagentes para a produção de polímeros de coordenação foram adquiridos à Sigma Aldrich, Labkem e Alfa Aesar e foram usados sem purificação adicional. As análises elementares (C, H, N e S) foram medidas num analisador Perkin Elmer PE 2400 Série II.

Os espectros de FTIR-ATR foram adquiridos na faixa de 4000–400 cm^{-1} com uma resolução de 2,0 cm^{-1} usando 64 varrimentos co-adicionadas num aparelho Shimadzu IRAffinity-1S equipado com um acessório ATR (*ZnSe Performance Crystal Plate*). (abreviações: vs – muito forte, s – forte, m – médio, w – fraco, br – amplo, sh – ombro). Utilizou-se uma estufa WTC *binder* para as reações hidrotérmicas.

Todos os bioCPs (de 1 a 6) foram sintetizados e moídos a pó fino. Os dados para difração de raios X e pós foram adquiridos usando um difratómetro de policristais D8 *Advance Bruker*, equipado com um detetor LYNXEYE-XE, utilizou-se radiação de grafite monocromática $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,5406 \text{ \AA}$, filtro de Ni), fenda de 0,6 ° e 40 kV e 30 mA. Para a caracterização qualitativa e para aumentar as estatísticas de contagem e perfis da forma do pico, parâmetros de coleta de dados de 2-50° (2 θ), foram empregues um tamanho do passo igual a 0,02° e velocidade de varrimento igual a 0,17° s^{-1} .

Os reagentes para a produção de filmes (filmes de agarose e fécula de batata) foram adquiridos comercialmente à Fisher Bioreagentes e Globo, e usados sem purificação adicional.

Para a produção dos filmes utilizou-se o aparelho de ultrassons Transsonic 660/H para homogeneizar os bioCPs no gel, e uma estufa Memmert 854 Schutzart Germany para secar os filmes.

A caracterização da estabilidade térmica dos filmes e dos bioCPs foi analisada através de análise termogravimétrica (TGA). Para a realização deste ensaio foi usado o equipamento de termogravimetria Perkin Elmer STA 6000. O ensaio realizou-se num intervalo de temperatura entre 30 °C e 800 °C, com uma velocidade de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera inerte. Com este ensaio foi possível determinar a temperatura de degradação e a massa residual a alta temperatura dos filmes de agarose e de fécula de batata.

Para os ensaios microbiológicos utilizou-se as bactérias *Escherichia coli* (ATCC25922) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Os meios de cultura preparados foram de Mueller-Hinton broth da marca Oxoid (ref CM0405), e Mueller-Hinton agar solidificado da Scharlau (01-

136-500). As células cresceram e diferenciaram-se numa incubadora Gallenkamp (37°C, condições aeróbias, 180 rpm) e os ensaios foram realizados numa câmara de fluxo laminar Safe Fast Classic 209 (152).

Nos ensaios citotóxicos utilizou-se linhas celulares tumorais humanas, células HepG2 (ECACC 85011430), provenientes do carcinoma hepatocelular de fígado humano.

As células HpG2 foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (L0106-500-500ML) da marca Biowest suplementado com 1% de solução antibiótico 100x (A5955-100ML) da Sigma e 1% de glutamina 20mM (25-005-CI-100ML Corning, 17-605E-100ML) da Lonza. Utilizou-se meio sem soro fetal bovino (FBS) e meio suplementado com 10% de FBS (S181BH-500ML) da Biowest. Utilizou-se uma solução PBS 1x (21-040-CV-500ML) da Corning, tripsina 10x (BE02-007E-100ML) da Lonza, para manter e manusear as células durante as culturas e ensaios.

Para os ensaios biológicos com a linha celular HepG2 o manuseamento foi feito numa câmara de fluxo laminar "Class II biohazard safety cabinet" ESCO, tendo as células sido mantidas numa incubadora de CO₂ Sanyo a uma temperatura constante de 37°C, em atmosfera húmida com 5% CO₂. O crescimento celular foi controlado com um hematócitometro Marienfeld Improved Double Neubauer, prof.: 0,100 mm; 0,0025 mm² e um microscópio de fase inversa Matic AE21. Os resultados dos ensaios testados foram obtidos através do leitor de microplacas Tecan Sunrise Remote A-502 a uma frequência de 490 nm com referência a 680 nm.

Os testes de LDH foram realizados com o kit "CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay" da Invitrogen, ThermoFisher Scientific.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3. Parte Experimental

O desenvolvimento do trabalho experimental compreendeu a realização de quatro fases:

1ª Fase: Síntese de bioCPs;

2ª Fase: Produção de filmes e dopagem com os bioCPs sintetizados;

3ª Fase: Testes microbiológicos aos filmes dopados;

4ª Fase: Testes citotóxicos aos filmes dopados.

3.1. Síntese de bioCPs

Foram preparadas duas famílias de polímeros de coordenação, em que os ligandos usados foram o ácido 4,4'-sulfonildibenzóico (H_2sdba) e o ácido 4,4'-oxibis benzóico (H_2obba). As fontes de metais usadas foram: $AgNO_3$ para a prata(I) (Ag^+), $Cu(CH_3COO)_2$ e $Cu(NO_3)_2 \cdot 2.5H_2O$ para o cobre(II) (Cu^{2+}) e $ZnCl_2$ para o zinco(II) (Zn^{2+}).

As referências dos bioCPs sintetizados, bem como os seus blocos de construção, encontram-se resumidos no esquema da Figura 10 e na Tabela 1.

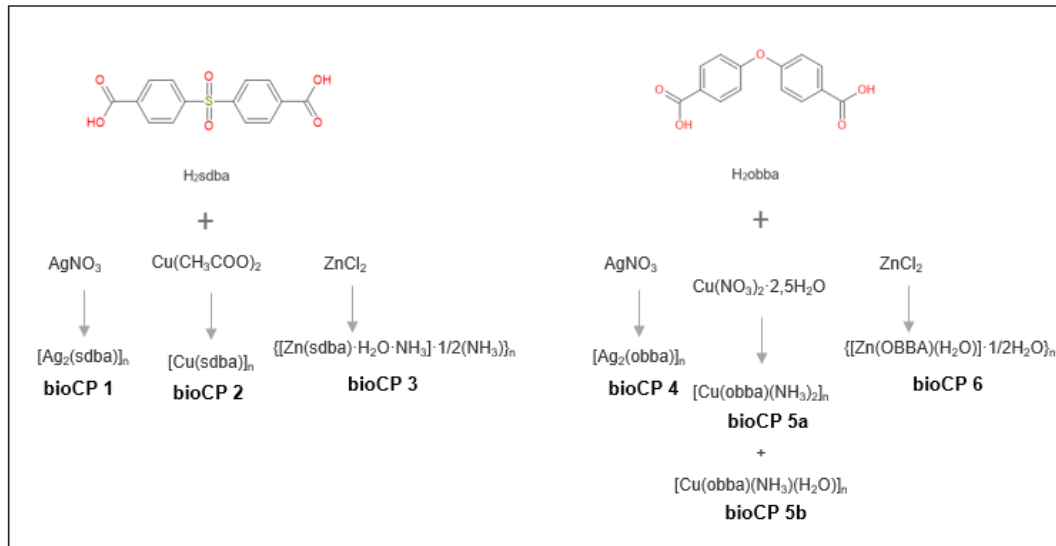
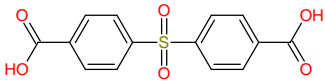
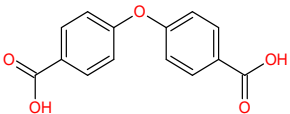


Figura 10 - Esquema geral das sínteses realizadas na formação de bioCPs.

Tabela 1 - Referências dos polímeros de coordenação sintetizados, metais e respectivos ligandos utilizados para a síntese.

Referência	Sal que fornece o metal	Ligando
1 [Ag ₂ (sdba)] _n	AgNO ₃	 ácido 4,4'-sulfonidibenzóico (H ₂ sdba)
2 {[Cu(sdba)·H ₂ O]·1.5H ₂ O} _n	Cu(CH ₃ COO) ₂	
3 {[Zn(sdba)·H ₂ O·NH ₃]·1/2(NH ₃) _n	ZnCl ₂	
4 [Ag ₂ (obba)] _n	AgNO ₃	 ácido 4,4'-oxibis benzóico (H ₂ obba)
5a [Cu ₂ (obba)(NH ₃)(OH)] _n e 5b [Cu(obba) _{0.5} (NH ₃) _n	Cu(NO ₃) ₂ ·2.5H ₂ O	
6 {[Zn(obba)(NH ₃) ₂] _n	ZnCl ₂	

3.1.1. Síntese dos bioCPs com o ligando ácido 4,4' – sulfonidibenzóico (H₂sdba)

3.1.1.1. Síntese do bioCP [Ag₂(sdba)]_n (1)

Num *vial* preparou-se uma solução de 170 mg (1 mmol) de nitrato de prata(I) (AgNO₃) com 5 mL de metanol e 1 mL de água destilada, com agitação a temperatura entre 40-50 °C até se obter dissolução completa da prata(I).

Num balão de fundo redondo adicionou-se 153 mg (0,5 mmol) de ácido 4,4'-sulfonidibenzóico, e dissolveu-se com 15 mL de acetonitrilo e 5 mL de metanol. Adicionou-se

6 mL de solução de hidróxido de amônia (8M) para desprotonar o ligando. A mistura ficou em agitação até homogeneização completa.

De seguida, misturou-se a solução de nitrato de prata(I) com a solução contendo o ligando (Figura 11) e deixou-se a agitar, durante 10 minutos, à temperatura ambiente (25 °C). Filtrou-se a mistura reacional com auxílio de um papel de filtro. Deixou-se a solução repousar durante 5 dias à temperatura ambiente de forma a evaporar lentamente e foram obtidos cristais brancos.

Os cristais foram filtrados, lavados com água destilada e secos. Obteve-se um rendimento de 57% (150 mg; 0,57 mmol) de bioCP 1.

Análise Elementar: $C_{14}H_8Ag_2O_5S$ ($1058,04 \text{ g mol}^{-1}$) calculado (%): C, 32.34; H, 1.55; S, 6.17. Experimental (%): C, 32.85; H, < 2.00; S, 7.00.

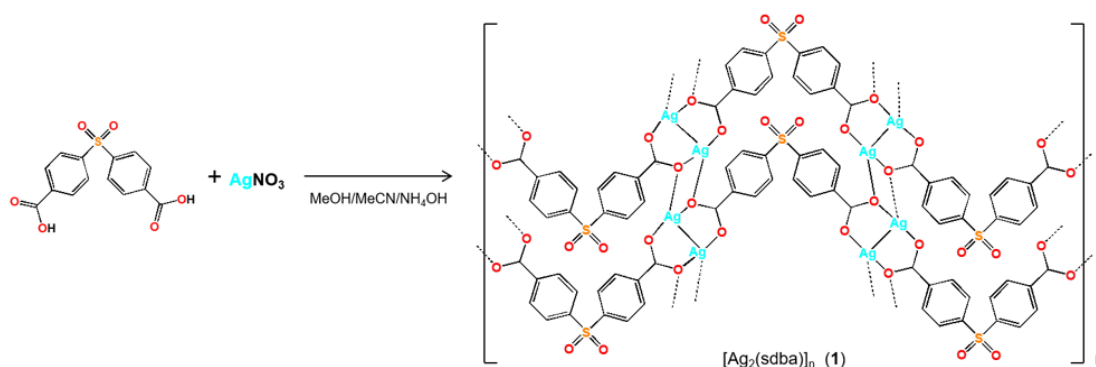


Figura 11 – Esquema reacional para obtenção do bioCP 1.

3.1.1.2. Síntese do bioCP $\{[Cu(sdba) \cdot H_2O] \cdot 1.5H_2O\}_n$ (2)

Este polímero de coordenação foi sintetizado por duas vias. No 1º método utilizou-se o mesmo processo utilizado na síntese do bioCP 1. No 2º método, procedeu-se à síntese através uma reação hidrotérmica.

1º método: síntese de bioCP 2 – via convencional

Para esta reação, adicionou-se 198 mg (1 mmol) de acetato de cobre(II) ($Cu(CH_3COO)_2$) a um *vial* contendo 5 mL de água destilada e 5 mL de etanol, e dissolveu-se.

Num balão de fundo redondo adicionou-se 153 mg (0,5 mmol) de ácido 4,4'-sulfonildibenzóico e dissolveu-se com 15 mL de água destilada, 10 mL de etanol e 1 mL de

hidróxido de amónia (8M). Agitou-se até a mistura ter ficado homogénea e com toda a suspensão dissolvida.

De seguida, misturou-se a solução de acetato de cobre(II) com a solução contendo o ligando (Figura 12) e deixou-se a agitar durante 10 minutos à temperatura ambiente. Filtrou-se a mistura reacional com auxílio de um papel de filtro. Deixou-se a solução repousar durante 5 dias à temperatura ambiente de forma a evaporar lentamente. Formaram-se cristais azuis-escuros.

Filtrou-se os cristais e lavou-se com água destilada. Secou-se num exsiccador durante cerca de 8 dias (até ficarem completamente secos). Obteve-se um rendimento de 38% (138 mg; 0,375 mmol) de produto.

2º método: síntese de bioCP 2 – via hidrotérmica

Adicionou-se 198 mg (1 mmol) de acetato de cobre(II), 153 mg (0,5 mmol) de ácido 4,4'-sulfonildibenzóico, 15 mL de água destilada e 10 mL de etanol a um reator hidrotérmico. Agitou-se a mistura durante 10 minutos e no final fechou-se o reator.

Colocou-se o reator na estufa a 160 °C durante 16 horas e procedeu-se a uma rampa de arrefecimento controlada. Realizou-se uma taxa de arrefecimento de 0,15 °C/min, até se alcançar os 25 °C.

Filtrou-se o pó obtido com o auxílio de um papel de filtro, e deixou-se a secar no exsiccador durante 8 dias. Obteve-se um rendimento de 97% (335 mg; 0,965 mmol) de produto.

Análise Elemental: $C_{14}H_{10}CuO_7S$ (385,8 g mol^{-1}) calculado (%): C, 43.58; H, 2.61; S, 8.31. Experimental (%): C, 40.78; H, 2.51; S, 8.26.

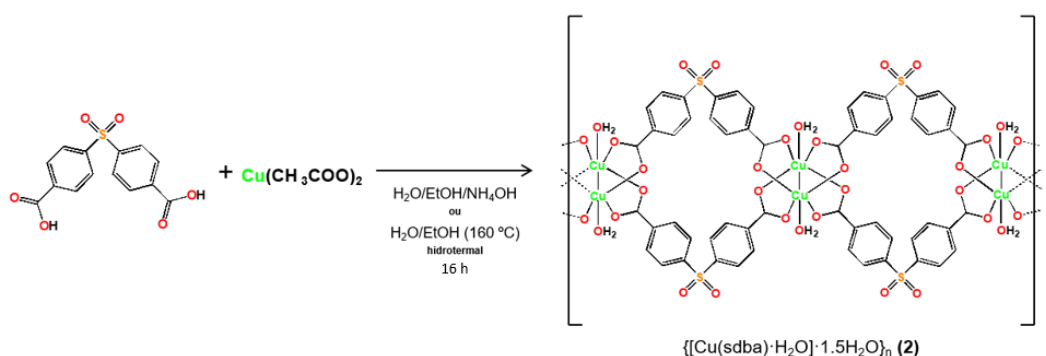


Figura 12 – Esquema reacional para obtenção do bioCP 2.

3.1.1.3. Síntese do bioCP $\{[\text{Zn}(\text{sdba})\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{NH}_3]\cdot 1/2(\text{NH}_3)\}_n$ (3)

Num *vial* preparou-se uma solução de 136 mg (1 mmol) de cloreto de zinco(II) (ZnCl_2) com 5 mL de metanol e 1 mL de água destilada, com agitação a temperatura entre 40-50 °C até se obter dissolução completa do zinco(II).

Num balão de fundo redondo adicionou-se 153 mg (0,5 mmol) de ácido 4,4'-sulfonildibenzóico, e dissolveu-se com 15 mL de acetonitrilo, 5 mL de etanol e 6 mL de hidróxido de amónia (8M). Agitou-se até a mistura ter ficado bem homogénea e com toda a suspensão dissolvida.

Misturou-se a solução de cloreto de zinco(II) com a solução contendo o ligando (Figura 13), deixou-se a agitar durante 10 minutos à temperatura ambiente. Filtrou-se a mistura reacional com auxílio de um papel de filtro. Deixou-se a solução repousar durante 5 dias à temperatura ambiente de forma a evaporar lentamente. Formaram-se cristais brancos.

Filtrou-se os cristais e lavou-se com água destilada. Secou-se num exsiccador durante cerca de 8 dias (até ficarem completamente secos). Obteve-se um rendimento de 40% (164 mg e 0,397 mmol) de bioCP 3.

Análise Elementar: $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_{14}\text{S}_2\text{Zn}_2$ ($826,5 \text{ g mol}^{-1}$) calculado (%): C, 40.69; H, 3.54; N, 5.08; S, 7.76. Experimental (%): C, 40.14; H, 2.89; N, 5.32; S, 7.98.

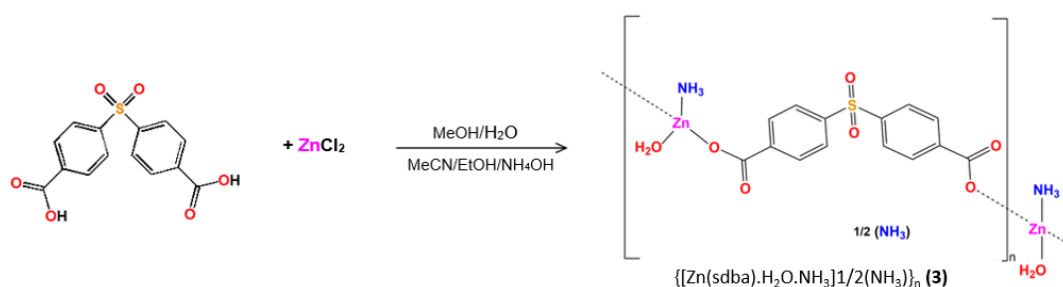


Figura 13 – Esquema reacional para obtenção do bioCP 3.

3.1.2. Preparação dos bioCPs com o ligando ácido 4,4'-oxibis benzóico (H₂obba)

3.1.2.1. Síntese do bioCP [Ag₂(obba)]_n (4)

Num *vial* preparou-se uma solução de 170 mg (1 mmol) de nitrato de prata(I) (AgNO₃) com 5 mL de metanol e 1 mL de água destilada, com agitação a temperatura entre 40-50 °C até se obter dissolução completa da prata(I).

Começou-se por adicionar 170 mg (1 mmol) de nitrato de prata(I) a um *vial* com 5 mL de etanol e 1 mL de água destilada. Deixou-se a agitar até se dissolver por completo o nitrato de prata(I).

Num balão de fundo redondo adicionou-se 179 mg (0,5 mmol) de ácido 4,4'-oxibis benzóico (Figura 14), e dissolveu-se com 15 mL de acetonitrilo, 5 mL de etanol e 13 mL de hidróxido de amónia (8M). Agitou-se até a mistura ter ficado bem homogeneia e com toda a suspensão dissolvida. De seguida, misturou-se a solução de nitrato de prata(I) com a solução contendo o ligando, deixou-se a agitar durante 10 minutos à temperatura ambiente. Filtrou-se a mistura reacional com auxílio de um papel de filtro. Deixou-se a solução repousar durante 5 dias à temperatura ambiente de forma a evaporar lentamente. Formaram-se cristais brancos.

Filtrou-se os cristais e lavou-se com água destilada. Secou-se num exsiccador durante cerca de 8 dias (até ficarem completamente secos). Obteve-se um rendimento de 17% (41mg; 0,170mmol) de bioCP 4.

Análise Elemental: C₄₂H₂₇Ag₆NO₁₅ (1432,9 g mol⁻¹) calculado (%): C, 35.21; H, 1.9; N, 0.98. Experimental (%): C, 35.94; H, < 2.00; N, < 0.50.



Figura 14 – Esquema reacional para obtenção do bioCP 4.

3.1.2.2. Síntese dos bioCPs $[\text{Cu}_2(\text{obba})(\text{NH}_3)(\text{OH})]_n$ (5a) e $[\text{Cu}(\text{obba})_{0.5}(\text{NH}_3)]_n$ (5b)

Num balão de fundo redondo adicionou-se 179 mg (0,5 mmol) de ácido 4,4'-oxibis benzóico (H_2obba) (Figura 15), e dissolveu-se este em 15 mL de acetonitrilo, 5 mL de etanol e 13 mL de hidróxido de amónia (8M). Agitou-se a temperatura entre 40-50 °C, até a mistura ter ficado bem homogenia e com toda a suspensão dissolvida.

Adicionou-se 10 mL (1 mmol) de nitrato de cobre(II) ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$) ao balão contendo a solução com o ligando.

Deixou-se a agitar durante 10 minutos à temperatura ambiente. Filtrou-se a mistura reacional com auxílio de um papel de filtro. Deixou-se a solução repousar durante 5 dias à temperatura ambiente de forma a evaporar lentamente.

Verificou-se que após os primeiros 3 dias formaram-se cristais roxos $[\text{Cu}_2(\text{obba})(\text{NH}_3)(\text{OH})]_n$ e 2 dias depois formaram-se cristais azuis-escuros $[\text{Cu}(\text{obba})_{0.5}(\text{NH}_3)]_n$. Filtrou-se os cristais e lavou-se com água destilada.

Secou-se os cristais num exsiccador durante cerca de 8 dias (até ficarem completamente secos). Obteve-se um rendimento 24% (180 mg; 0,239 mmol) de bioCP 5a, e um rendimento de 55% (229 mg; 0,551 mmol) de bioCP 5b.

Análises Elementares: $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{CuN}_2\text{O}_5$ (353,8 g mol^{-1}) calculado (%): C, 47.52; H, 3.99; N, 7.92. Experimental (%): C, 47.67; H, 3.69; N, 7.51.

$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{Cu}_2\text{NO}_5$ (400,3 g mol^{-1}) calculado (%): C, 42.00; H, 2.77; N, 3.50. Experimental (%): C, 43,24; H, 2.69; N, 3.83.

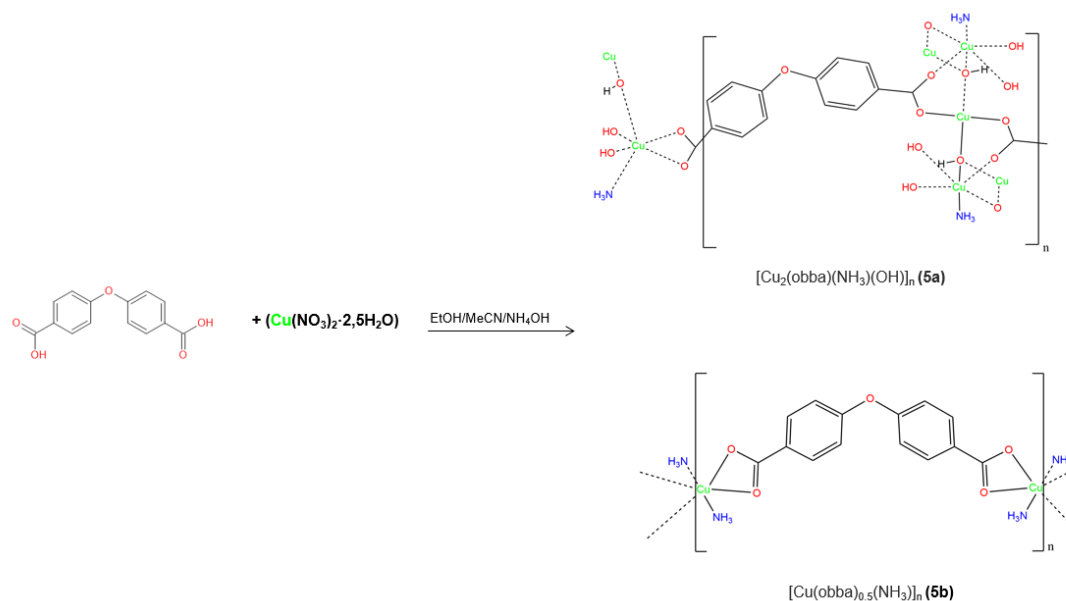


Figura 15 – Esquema reacional para obtenção dos bioCPs 5a e 5b.

3.1.2.3. Síntese do bioCP $\{[\text{Zn}(\text{obba})(\text{NH}_3)_2]_n$ (6)

Num *vial* preparou-se uma solução de 136 mg (1 mmol) de cloreto de zinco(II) (ZnCl_2) com 5 mL de metanol e 1 mL de água destilada, com agitação a temperatura entre 40-50 °C até se obter dissolução completa do zinco(II).

Num balão de fundo redondo adicionou-se 179 mg (0,5 mmol) de ácido 4,4'-oxibis benzóico (Figura 16), e dissolveu-se com 15 mL de acetonitrilo, 5 mL de etanol e 13 mL de hidróxido de amónia (8M). Agitou-se até a mistura ter ficado bem homogenia e com toda a suspensão dissolvida.

Misturou-se a solução de cloreto de zinco(II) com a solução contendo o ligando, deixou-se a agitar durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Filtrou-se a mistura reacional com auxílio de um papel de filtro. Deixou-se a solução repousar durante 5 dias à temperatura ambiente de forma a evaporar lentamente. Formaram-se cristais brancos.

Filtrou-se os cristais e lavou-se com água destilada. Secou-se num exsiccador durante cerca de 8 dias (até ficarem completamente secos). Obteve-se um rendimento de 46% (155 mg; 0,458 mmol) de bioCP 6.

Análise Elemental: $C_{28}H_{25}N_3O_{10}Zn_4$ ($825,1 \text{ g mol}^{-1}$) calculado (%): C, 40.76; H, 3.05; N, 5.09. Experimental (%): C, 40.32; H, 2.97; N, 4.95.

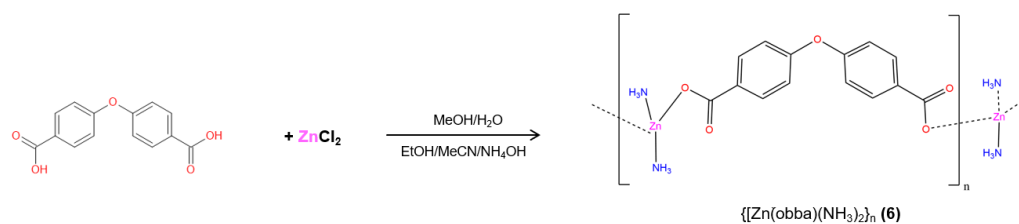


Figura 16 - Reação entre o ligando ácido 4,4'-oxibis benzoico e o cloreto de zinco(II).

A Figura 17 ilustra o aspeto físico e morfológico dos diferentes cristais obtidos para os sete polímeros de coordenação.

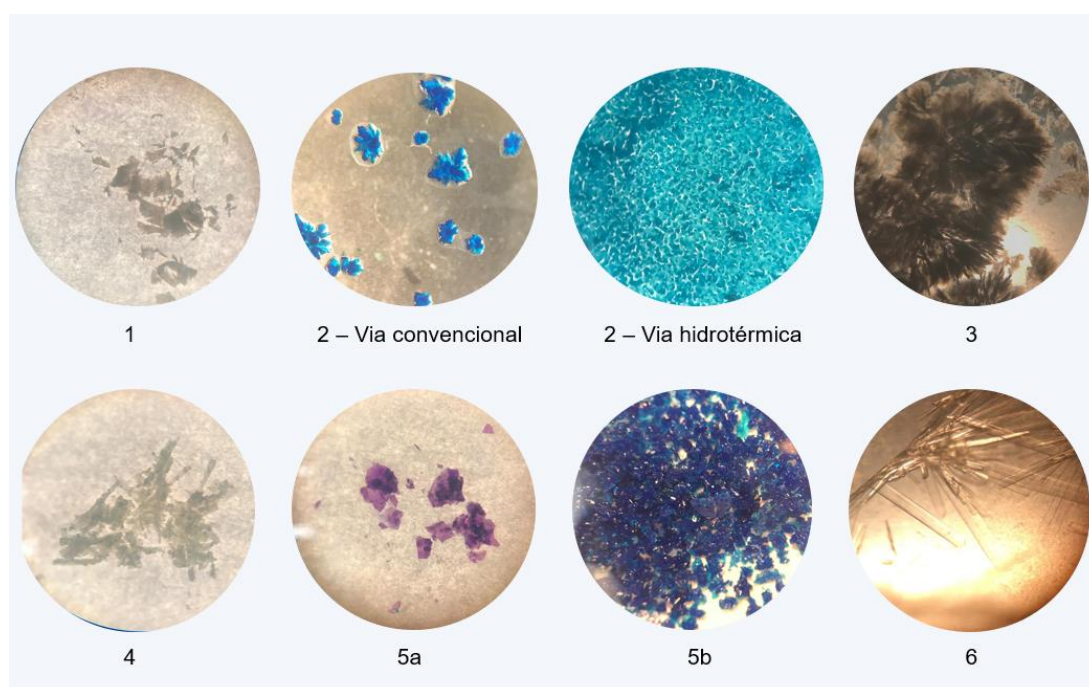


Figura 17 - Cristais sintetizados com respetiva legenda.

3.2. Produção de filmes derivados de agarose e fécula de batata

3.2.1. Produção de filmes de agarose

Para a produção de cada filme de agarose, dissolveram-se 0,2 g de agarose em 20 mL de água destilada, com agitação durante 10 minutos a 80 °C. Após a dissolução, adicionaram-se os bioCPs sintetizados, nas quantidades em estudo e que se encontram definidas na bioCP tabela 4 no Anexo I. A dispersão dos bioCPs na matriz de agarose foi promovida utilizando um equipamento de ultrassons. Após a mistura estar homogênea, verteu-se o conteúdo para uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro e colocaram-se as placas na estufa a 80 °C, durante 24 horas a secar, e posteriormente os filmes foram guardados no exsiccador, conforme ilustrado na Figura 18.

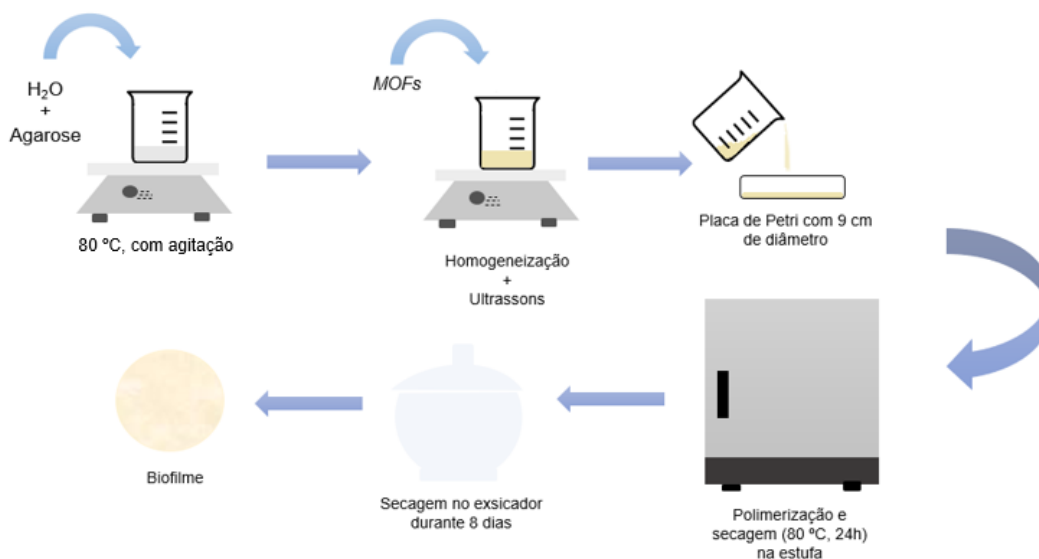


Figura 18 - Preparação de filme de agarose dopado.

3.2.2. Produção de filmes de fécula de batata

Para a produção de cada filme de fécula de batata, dissolveu-se 2,0 g de fécula de batata em 20 mL de água destilada com auxílio de temperatura (80 °C). Após a dissolução da fécula de batata na água, adicionou-se 2 mL de glicerol à mistura. Mexeu-se bem até a mistura ficar homogênea, e de seguida adicionou-se os bioCPs. As massas de bioCPs adicionadas na produção dos filmes encontram-se na Tabela 5 no Anexo I.

A dispersão dos bioCPs na matriz de fécula foi promovida utilizando um equipamento de ultrassons. Após a mistura estar homogênea, verteu-se o conteúdo para uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro e colocaram-se as placas na estufa a 80 °C, durante 24 horas a secar, e posteriormente os filmes foram guardados no exsiccador, conforme ilustrado na Figura 19.

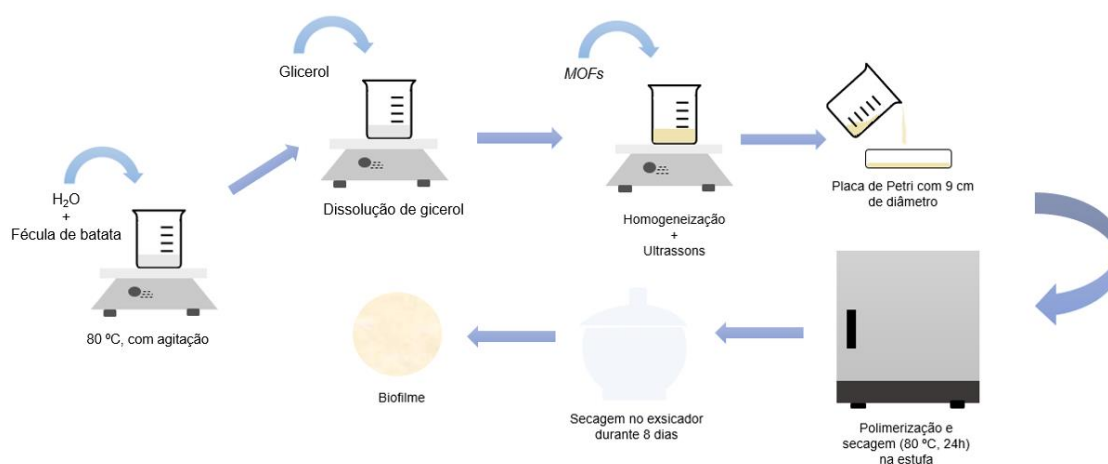


Figura 19 - Preparação de filme de fécula de batata dopado.

O aspecto dos filmes de agarose e de fécula de batata é ilustrado na Figura 20a e 20b, respectivamente.

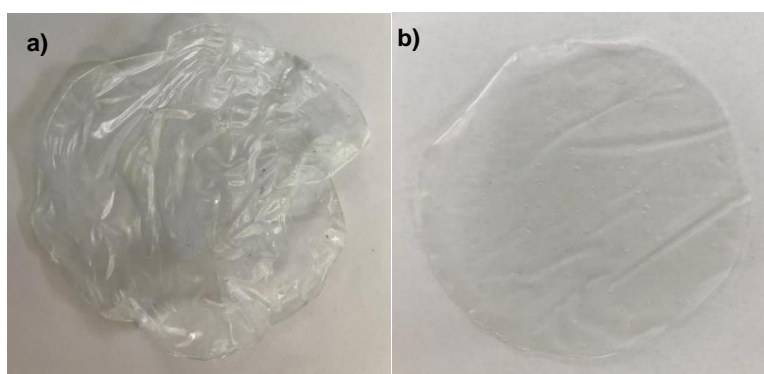


Figura 20 – Filmes produzidos: a) filme de agarose puro (branco); b) filme de fécula de batata puro (branco).

Para realizar os ensaios microbiológicos e os ensaios citotóxicos foi necessário cortar discos de 0,9 cm de diâmetro dos filmes produzidos, conforme se apresenta na Figuras 21 e 22.

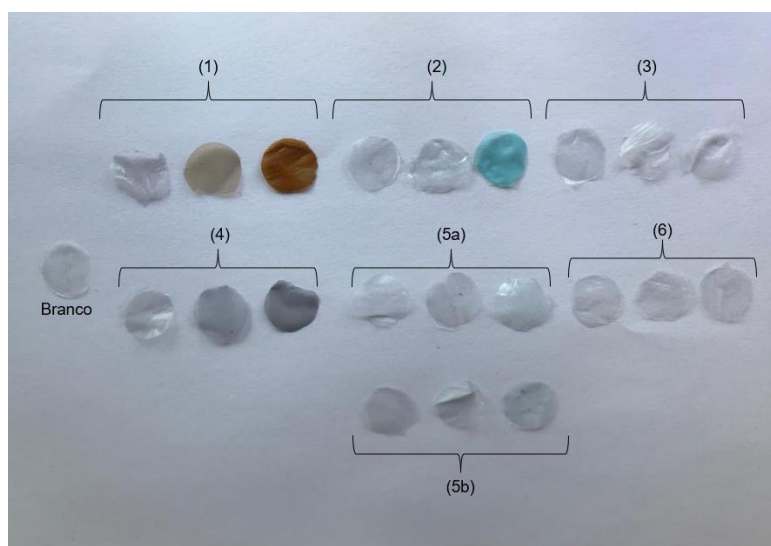


Figura 21 - Discos de agarose do filme branco e dos filmes dopados com bioCPs 1, 2, 3, 4, 5a, 5b e 6. Discos dopados com cada bioCP com as concentrações de 1%; 2,5% e 5%, pela respetiva ordem.

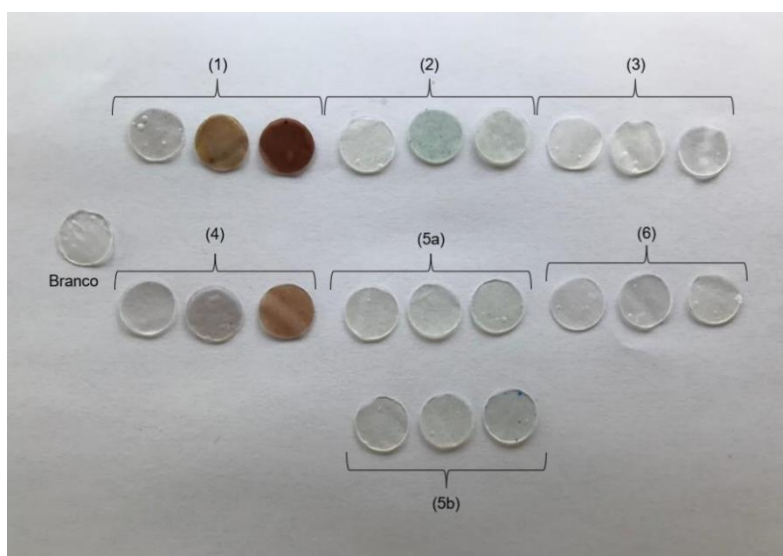


Figura 22 - Discos de fécula de batata do filme branco e dos filmes dopados com bioCPs 1, 2, 3, 4, 5a, 5b e 6. Discos dopados com cada bioCP com as concentrações de 1%; 2,5% e 5%, pela respetiva ordem.

3.3. Testes microbiológicos

Testou-se os filmes dopados com bioCPs em culturas de *Escherichia coli* (bactéria Gram-negativa) e de *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva). Nestes testes foi usada a técnica de sobreposição *soft-agar*. As culturas bacterianas tiveram de ser cultivadas em meio líquido *Mueller-Hinton broth* (MHB) a 37 °C em condições aeróbicas e sob agitação (180 rpm) durante uma noite. No dia seguinte, fez-se um novo meio *Mueller-Hinton broth* misturado com 0,5% de ágar técnico (solução de *soft-agar*) mantido a 60 °C, onde se diluíram as colónias de bactérias crescidas durante a noite, para uma concentração final de 1×10^6 unidades formadoras de colónias (cfu/mL⁻¹). De seguida, retirou-se 6 mL desta solução e adicionou-se a uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro, por cima de 10 mL de *Mueller-Hinton agar* solidificado. Após a solidificação dos meios, adicionou-se os discos de amido de batata e os discos de agarose preparados previamente, e deixou-se a incubar durante 24 h a uma temperatura de 37 °C. Após as 24 h, analisou-se o aparecimento de zona de inibição do crescimento bacteriano, mediu-se o halo de inibição e fotografaram-se as placas. [55, 56]

3.4. Testes citotóxicos

Para os ensaios citotóxicos utilizou-se células de linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2). Estas células foram descongeladas, e inoculadas num frasco T25 com 7 mL de meio DMEM, foram incubadas na incubadora a 37 °C durante 2 dias, e depois fez-se o *scale-up* para um frasco T75. Para isso foi necessário:

- 1º - Descartar o meio antigo;
- 2º - Lavar as células com PBS para limpar os resíduos de meio;
- 3º - Tripsinização das células com tripsina 10x;
- 4º - Transferir as células para novo frasco T75 com 14 mL de meio DMEM. O meio inativa a tripsina;
- 5º - Incubar células na incubadora.

Na Figura 23 visualiza-se a captação das células em estudo.

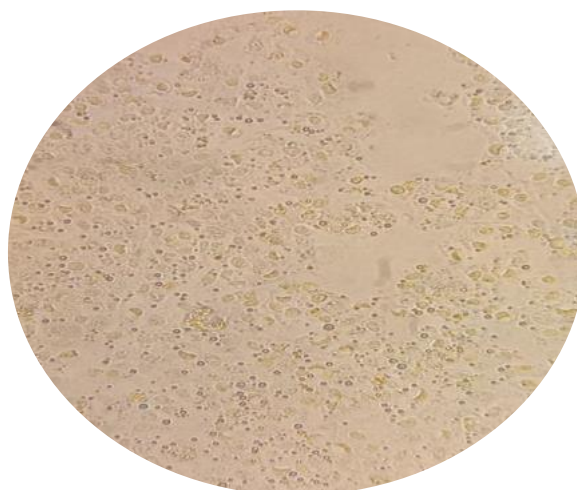


Figura 23 - Captação de células HepG2 através de microscópio. Zoom x200.

O presente estudo teve como objetivo investigar a resposta das células HepG2 frente à exposição dos filmes de bioCPs 1 e 2 com concentração de 5%. Utilizou-se o Kit de Ensaio de Citotoxicidade CyQUANT™ LDH para os ensaios de citotoxicidade. Foram testados os filmes de bioCPs e os bioCPs isolados, em contacto direto com as células, e por lixiviação de um *transwell insert* (Figura 24).

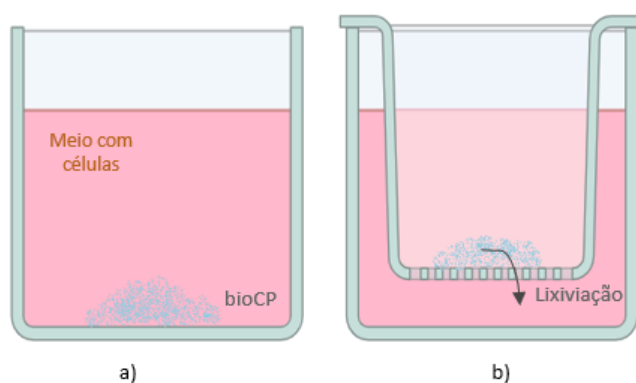


Figura 24 - Teste aos bioCPs isolados por: a) método de contacto direto; b) método de lixiviação.

Usou-se como ensaios de controlo, água para verificar a lise espontânea, e tampão de lise para verificar a lise máxima.

Descrição de desenvolvimento experimental para a realização do teste de Citotoxicidade CyQUANT™:

Começou-se por adicionar a cada poço de uma placa de 12 poços, 2 mL de meio DMEM sem FBS. Este meio continha uma concentração de células HepG2 de 5×10^4 células/mL de meio. Deixou-se a incubar durante 3 dias. Após os 3 dias, adicionou-se os discos de filme de bioCPs esterilizados a cada poço, retirou-se o meio antigo, e adicionou-se 1 mL do mesmo meio a cada poço. Deixou-se incubar durante 24 horas. Após 24 horas de incubação, adicionou-se 100 μ L de água destilada esterilizada ao poço “Espontâneo” e 100 μ L de tampão lise ao poço “Lise máxima”, e deixou-se incubar por 45 minutos na incubadora.

De seguida, transferiu-se 50 μ L de cada meio de amostra para uma placa de 96 poços, em duplicado. Adicionou-se a cada poço da placa de 96 poços, 50 μ L de mistura de reação, e deixou-se a reagir durante 30 minutos, protegido de luz com papel de alumínio, à temperatura ambiente. Após os 30 minutos, adicionou-se 50 μ L de solução “stop” a cada poço, para parar a reação. Por fim, mediu-se a absorvância a 490 nm e 680 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

Após a síntese dos bioCPs foi necessário proceder à sua caracterização estrutural e topológica.

4.1. Descrição estrutural e topológica

4.4.1 Descrição estrutural para os bioCPs 1-6

O bioCP 1 apresenta uma estrutura cristalina 2D com uma composição química em concordância com os dados de análise elementar, $\{Ag_2(\mu_4\text{-sdba})\}_n$, como se pode ver na Figura 25. As distâncias das ligações C–O dos grupos COO^- são semelhantes e estão de acordo com as análises na região do infravermelho. Os íões de Ag(I) assumem uma geometria de “gangorra” levemente distorcida, $\{AgO_3Ag^{\text{ii}}\}$, coordenada por três átomos de O de três ligandos $\text{H}_2\text{-sdba}^{2-}$. Os comprimentos de ligação Ag–O em 1 são 2,152 (5) Å, [Ag1–O2], 2,171 (5) Å, [Ag1–O1ⁱ] e 2,695 (7) Å, [Ag1–O1^{iv}].

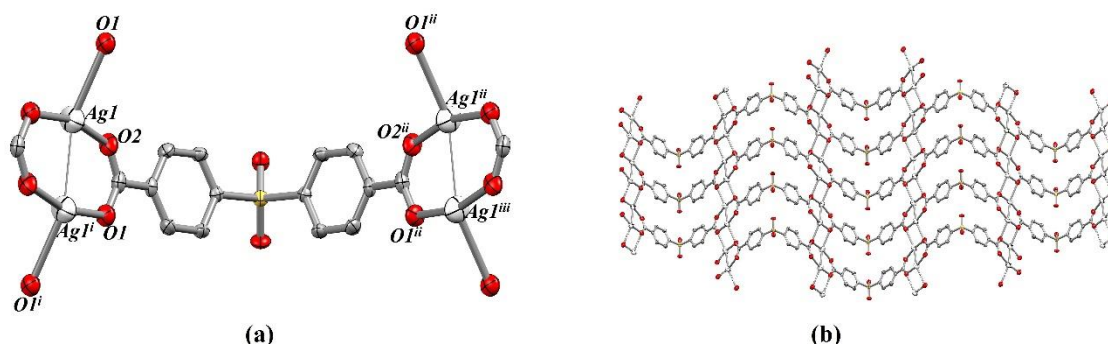


Figura 25 – (a) Representação da estrutura cristalina do bioCP 1, $\{Ag_2(\mu_4\text{-sdba})\}_n$. (b) Representação da estrutura cristalina 2D do bioCP 1. Alguns átomos foram omitidos para maior clareza. Os elipsoides térmicos foram representados com o nível de probabilidade de 50%. Código de simetria: **i**(-x, 1-y, 1-z), **ii**(1+x, 1/2-y, z) e **iii**(-x, -1/2+y, 1-z).

Por outro lado, o bioCP 2, $\{[Cu(\text{sdba})\cdot\text{H}_2\text{O}]\cdot 1.5\text{H}_2\text{O}\}_n$, adota uma estrutura de cadeia 1D (Figura 26), onde os átomos de Cu(II) apresentam uma geometria piramidal quadrada distorcida formada por quatro átomos de oxigénio carboxilato em ponte e duas moléculas de água (distâncias Cu...O em 1,961(3)-2,959(3) Å) além da distância Cu...Cu de 2.6244(15) Å, que produz unidades em forma de “pás”, $\{Cu_2O_{10}\}$, (“*paddlewheel*”). Para mais detalhes consultar referência 57.

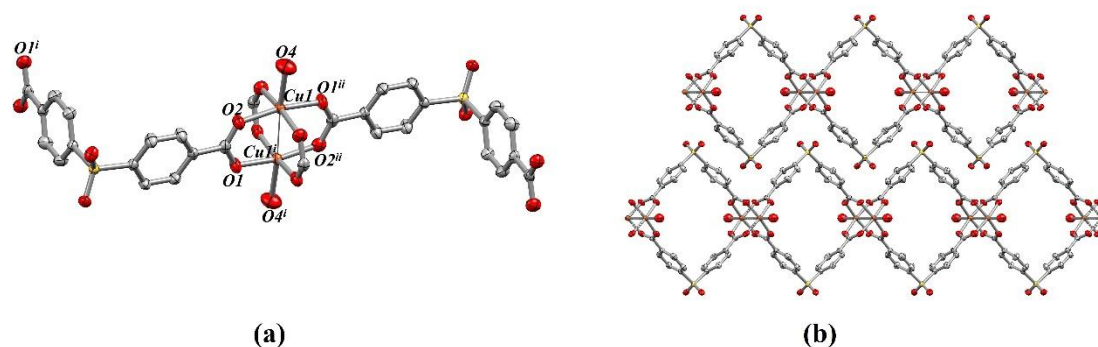


Figura 26 - **(a)** Representação das cadeias 1D formadas pelos íons Cu(II) e pelos ligandos sdba²⁻. **(b)** Representação da estrutura cristalina 2D do bioCP 2. Alguns átomos foram omitidos para maior clareza. Os elipsoides térmicos com probabilidade de 50%. Código de simetria: **i**(1-x, y, 2-z), **ii**(1-x, 1-y, 2-z).

O bioCP 4 tem cristalização no grupo espacial *Pbcn* do sistema ortorrômbico, exibe cadeias de ondas que consistem em unidades binucleares de prata(I) ligadas por ligandos obba²⁻ e, conectam-se a uma rede bidimensional por interações fracas Ag–O, como se pode ver na Figura 27.

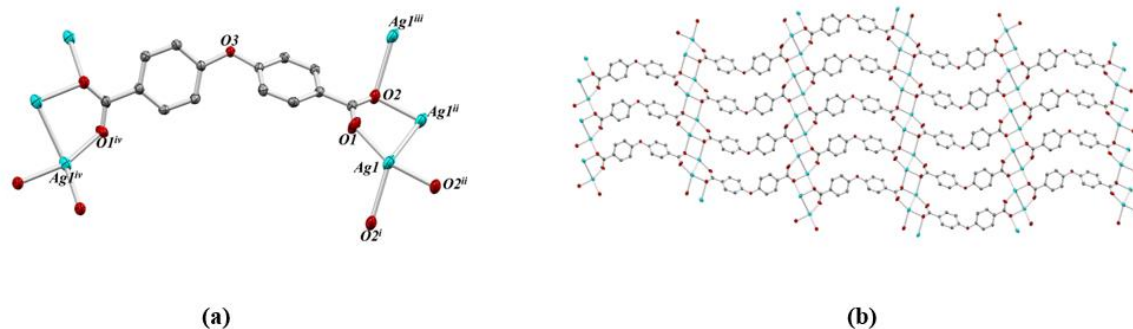


Figura 27 - **(a)** Representação das cadeias 1D formadas pelos íons Ag⁺ e pelos ligandos obba²⁻. **(b)** Uma vista da rede 2D do bioCP 4. Alguns átomos foram omitidos para maior clareza. Os elipsoides térmicos com probabilidade de 50%. Código de simetria: **i**(x, -1+y, z), **ii**(1-x, -y, 1-z), **iii**(x, 1+y, z), **iv**(1-x, y, ½-z).

O bioCP 5a apresenta uma estrutura 1D com formula molecular $\{\text{Cu}(\mu_2\text{-OBBA})_{0.5}(\text{NH}_3)\}_n$, como mostrado na Figura 28. Observa-se a proporção química de um íon Cu(II), uma molécula

de NH_3 e metade do ligando obba. O Cu1 apresenta uma deformação tetraédrica e os comprimentos de ligação de Cu-O e Cu-N são 1,964 (3) Å e 2,000 (3) Å respectivamente. Além disso, observa-se que o bioCP 5a é uma estrutura em camadas 2D através de ligações Hidrogénio, que é formada por uma cadeia 1D ondulada. Para mais detalhes em relação as estruturas cristalinas podem ser consultados na referência 58.

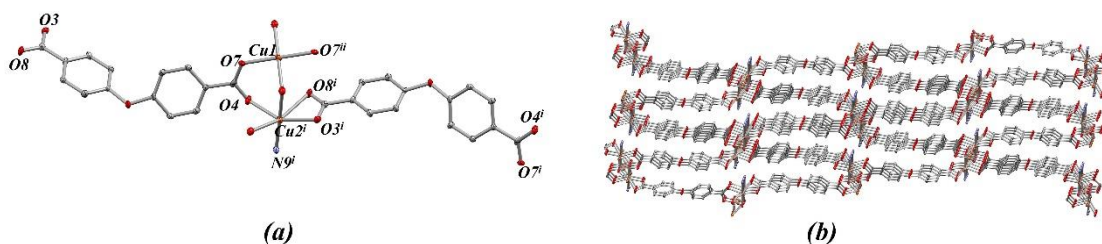


Figura 28 - **(a)** Representação da estrutura cristalina do bioCP 5a, $\{\text{Cu}_2(\text{obba})(\text{NH}_3)(\text{OH})\}_n$ bem como o ambiente de coordenação dos iões Cu(II). **(b)** Apresentação da estrutura 3D do bioCP 5a. Os elipsoides térmicos foram representados com 50%. Alguns átomos são omitidos para maior clareza.

Código de simetria: **i**($\frac{1}{2} - X$, $-\frac{1}{2} + y$, $\frac{1}{2} - z$), **ii**($1-x$, $1-y$, $1-z$).

Por outro lado, o bioCP 5b exibe uma estrutura cristalina 3D na proporção química de dois iões de Cu(II), um ligando obba, uma molécula de NH_3 e um anião OH^- na estrutura cristalina, $\{\text{Cu}(\text{obba})(\text{NH}_3)(\text{OH})\}_n$ (Figura 29). Os dados estão de acordo com os dados de IV e de análise elementar. Na estrutura cristalina, observa-se dois diferentes ambientes de coordenação para os iões de cobre(II). Um dos iões de cobre(II), Cu1, coordena-se com dois átomos de oxigénios derivados de diferentes ligandos obba e dois átomos de O de OH^- , levando à formação de uma geometria quadrática plana distorcida, enquanto outro ião de Cobre(II), Cu2, coordena-se a cinco outros átomos derivados de dois átomos de O de diferentes ligandos obba, dois átomos de O de OH^- e um de NH_3 gerando uma geometria tetraédrica distorcida.

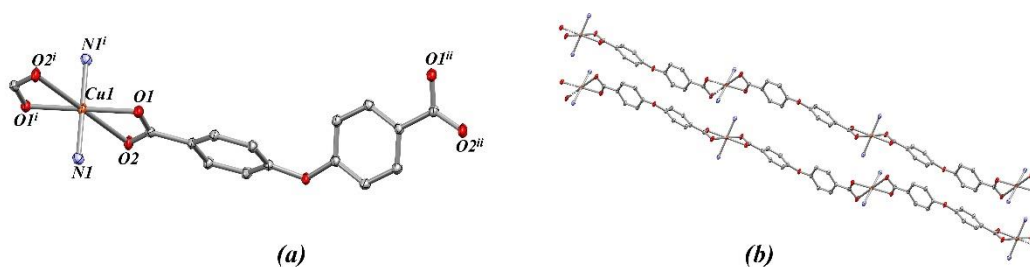


Figura 29 - **(a)** Ambiente de coordenação dos iões Cu(II) no bioCP 5b, $\{\text{Cu}(\text{OBBA})_{0.5}(\text{NH}_3)\}_n$. **(b)** Estrutura das cadeias 1D onduladas no bioCP 5b. Os elipsoides térmicos foram representados com 50% de probabilidade e alguns átomos foram omitidos. Código de simetria: **i**(3/2-x, 1/2-y, 1-z) e **ii**(1-x, y, 3/2-z).

Já a estrutura cristalina do bioCP 6 indicou uma fórmula molecular de $\{\text{Zn}(\mu\text{-obba})(\text{NH}_3)_2\}_n$, formando um polímero 1D linear no estado sólido com torções entre os anéis derivados do ácido carboxílico. Observa-se que os iões de zinco apresentam uma geometria tetraédrica formada pela coordenação com dois átomos de N derivados das moléculas de NH_3 e dois átomos de oxigénio derivados dos grupos carboxilatos, Figura 30.

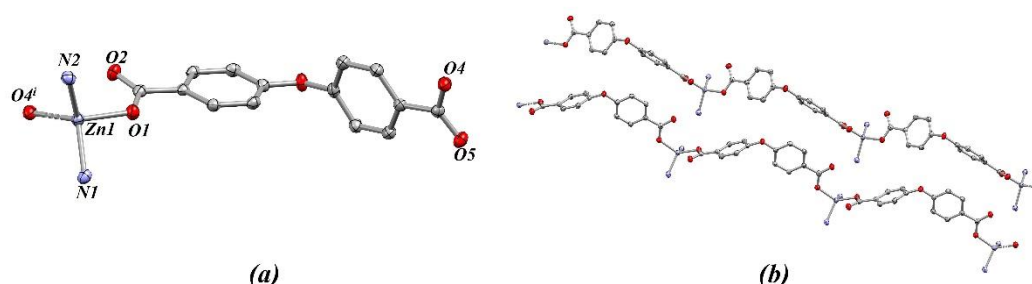


Figura 30 - **(a)** Representação da estrutura do bioCP 6, $\{\text{Zn}(\mu\text{-obba})(\text{NH}_3)_2\}_n$. **(b)** Cadeias 1D formadas pela coordenação em ponte com os grupos carboxilatos do ligando. Código de simetria: **i**(1+x, y, 1+z). Os elipsoides térmicos foram representados com 50% de probabilidade.

Os padrões experimentais de difração de raios X por policristais foram comparados com padrões simulados derivados de dados de monocristal para os bioCPs, e os picos de difração confirmam a estrutura cristalina para os bioCPs. Ainda é possível notar uma boa cristalinidade além dos dados serem representativos para as amostras sintetizadas, pequenas impurezas podem ser observadas nas amostras dos bioCPs 2 e 5a, no entanto, não são expressivas para os resultados. O bioCP 6, no entanto, apresenta alguns picos derivados de impurezas indicando que ainda é necessária uma otimização do processo de síntese para garantir qualidade e pureza das fases cristalinas. As Figuras 31, 32 e 33 mostram os padrões de

difração de raios X em pó para os bioCPs 1, 2, 4, 5a e 5b. Já nas Figuras 34 e 35, é apresentado os dados de difração de raios X para os bioCPs 3 e 6.

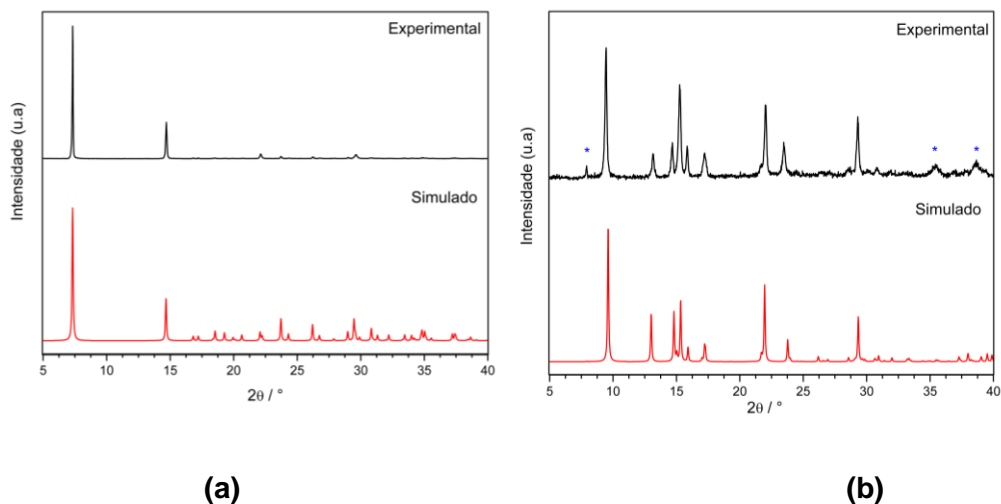


Figura 31 - Dados de difração de raios X de policristais para os bioCPs 1 e 2 em (a) e (b), respectivamente. Código de cor: Linhas Pretas = Dados experimentais, linhas vermelhas = Dados simulados a partir da estrutura cristalina.

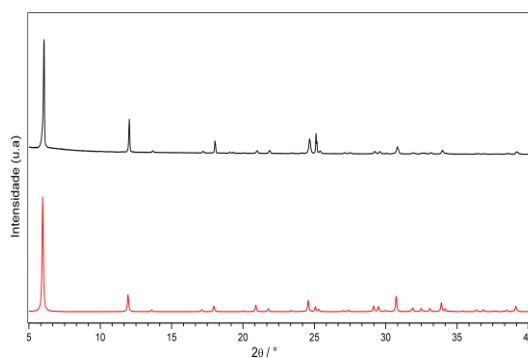


Figura 32 - Dados de difração de raios X de policristais para o bioCP 4. Código de cor: Linhas Pretas = Dados experimentais, linhas vermelhas = Dados simulados a partir da estrutura cristalina.

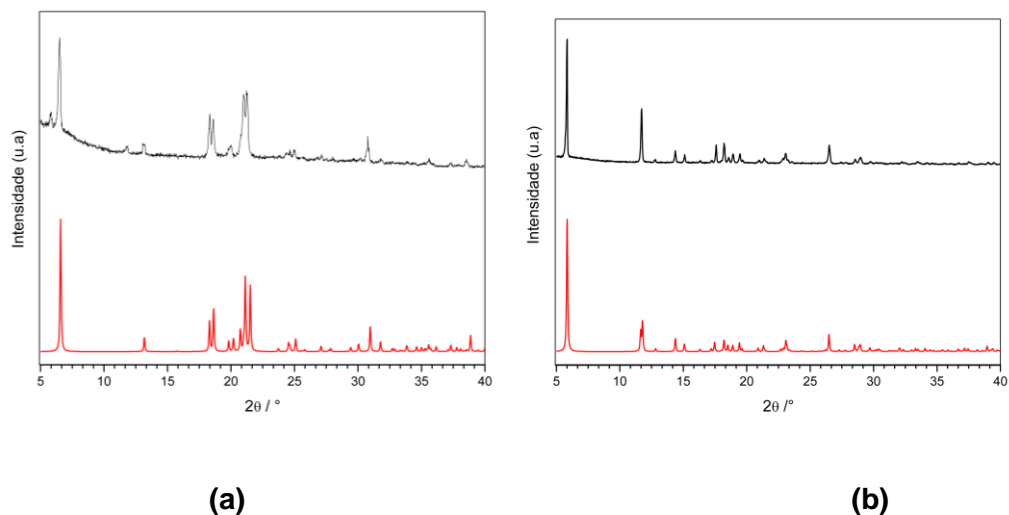


Figura 33 - Dados de difração de raios X de policristais para os bioCPs 5a e 5b em (a) e (b), respectivamente. Código de cor: Linhas Pretas = Dados experimentais, linhas vermelhas = Dados simulados a partir da estrutura cristalina.

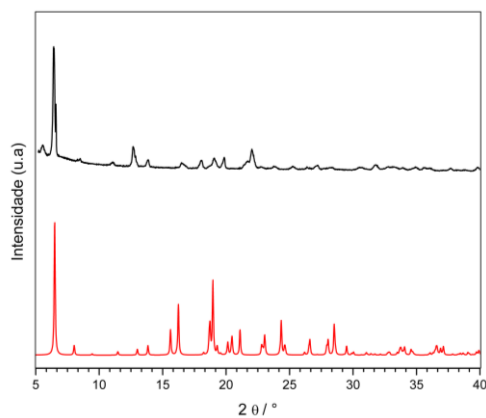


Figura 34 - Dados de difração de raios X de policristais para o bioCP 6. Código de cor: Linhas Pretas = Dados experimentais, linhas vermelhas = Dados simulados a partir da estrutura cristalina.

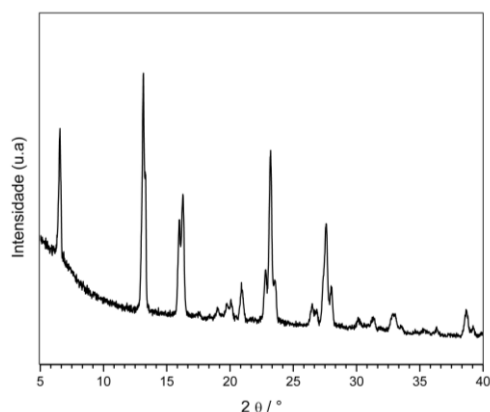


Figura 35 - Dados de difração de raios X de policristais para os bioCPs 3. Código de cor: Linhas Pretas = Dados experimentais, linhas vermelhas = Dados simulados a partir da estrutura cristalina.

4.2. Análise de FTIR-ATR

A técnica analítica FTIR-ATR, foi utilizada para investigar eventuais alterações macromoleculares e possíveis interações estabelecidas entre os polímeros base e os diferentes bioCPs ativos estudados. A sua caracterização centrou-se na análise dos bioCPs isolados, filmes dopados com os bioCPs e filmes controlo, e observação de alterações significativas na estrutura química dos filmes dopados.

Os espectros de infravermelho para o ligando H₂sdba em conjunto com os bioCPs 1, 2 e 3 encontram-se representados na Figura 36.

Os espectros de infravermelho para o ligando H₂obba em conjunto com os bioCPs 4, 5a, 5b e 6 encontram-se representados na Figura 37.

As atribuições espectroscópicas estão de acordo com os dados experimentais encontrados na literatura para ácidos carboxílicos e sulfocarboxílicos.

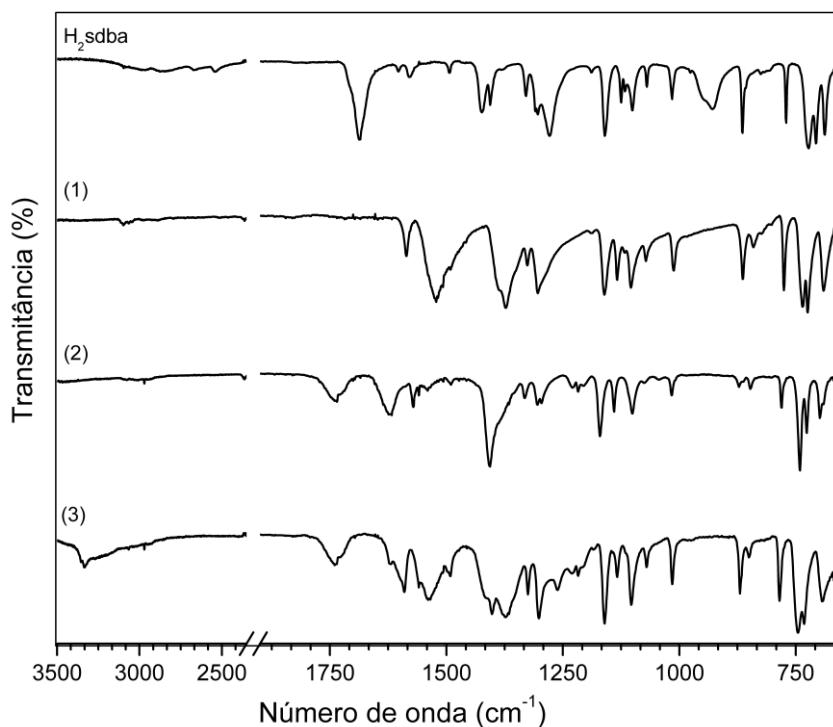


Figura 36 - Espectros de FTIR-ATR para o ligando H₂sdba e para os bioCPs 1, 2 e 3.

Analisando o espectro de FTIR-ATR do ligando H₂sdba, observa-se entre os 1160-1116 cm⁻¹ as bandas fortes de alongamento características do grupo SO₂, e entre os 775-690cm⁻¹ as bandas fortes de deformação características do grupo CH do anel benzênico.

Estas bandas também são visíveis nos espectros de todos os bioCPs, o que significa que o ligando está presente nos bioCPs 1, 2 e 3.

Verifica-se também que o espectro do ligando contém uma banda de deformação angular do grupo hidróxilo (OH) do anel benzênico aproximadamente aos 960 cm⁻¹. Esta banda referente ao grupo hidróxilo já não se encontra presente no espectro dos restantes bioCPs, o que sugere que se dá a coordenação do ligando com o íon metálico no local do grupo OH.

Outra banda característica do espectro do ligando que desaparece após a coordenação do ligando com o íon metálico é a banda característica do grupo carbonilo (CO) aos 1688 cm⁻¹. Verifica-se que esta não se encontra presente nos espectros dos bioCPs 1, 2 e 3. Assim, estas bandas são indicativas da coordenação do ligando com o íon metálico.

Observa-se também na Figura 36 que as bandas características do grupo carboxílico protonado (COOH) do espectro do ligando desaparecem nos restantes espectros dos bioCPs, e

formam-se novas bandas relativas aos grupos carboxilatos (COO^-) na região dos $1650\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$.

Por fim, analisando o espectro do bioCP 3, verifica-se que apresenta uma ampla absorção na região do infravermelho na faixa dos $3500\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ referente ao modo de estiramento de moléculas de água e ao grupo carboxílico.

A $1740\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$ verifica-se para os bioCPs 2 e 3 que em decorrência do alargamento das bandas em todo o espectro, indicativo de hidratação, sugere que estes cristais se encontravam hidratados.

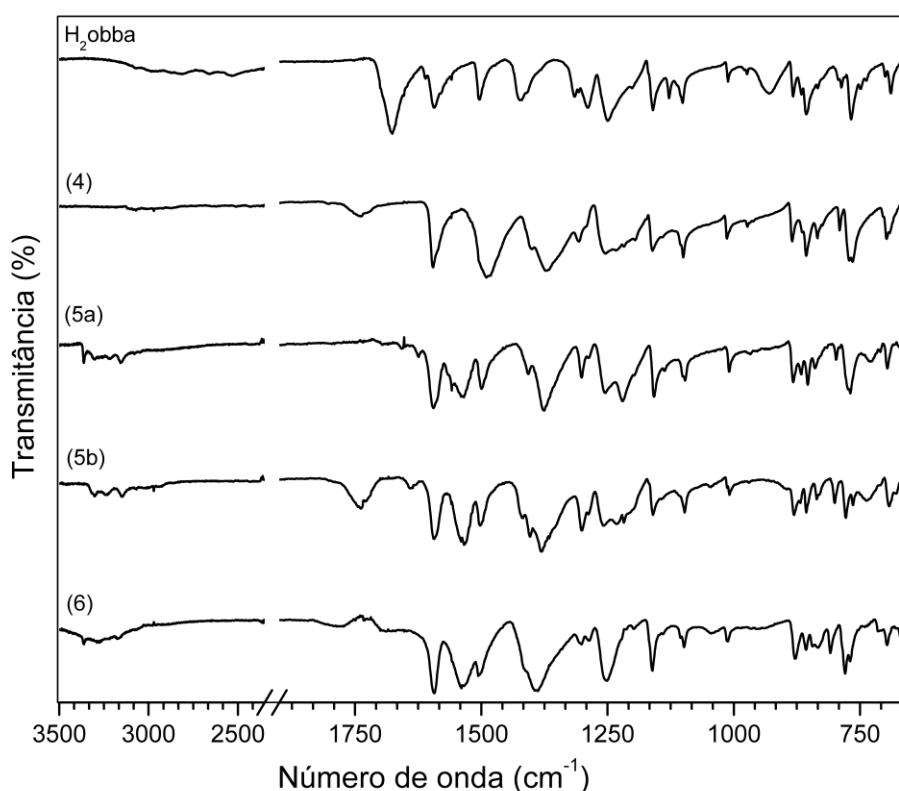


Figura 37 - Espectros de FTIR-ATR para o ligando H_2obba e para os bioCPs 4, 5a, 5b e 6.

Analisando o espectro de FTIR-ATR do ligando H_2obba , observa-se entre os $1315\text{-}1011\text{ cm}^{-1}$ bandas fortes de alongamento características do grupo éter (COC), e na região dos $856\text{-}690\text{ cm}^{-1}$ as bandas fortes de deformação características do grupo CH do anel benzênico. Estas bandas mantêm-se presentes nos espectros dos bioCPs 4, 5a, 5b e 6.

A presença dos grupos hidroxilo e carbonilo é mais uma vez evidenciada no espectro do ligando, notavelmente nas regiões de 930 cm^{-1} e 1676 cm^{-1} , respetivamente. No entanto, ao analisar os espectros dos bioCPs, nota-se a ausência dessas bandas, indicando efetiva

coordenação entre o ligante e o íon metálico. Além disso, as bandas características do grupo carboxílico protonado (COOH) presentes no espectro do ligando não são mais identificadas nos demais espectros dos bioCPs. Ainda, surgem novas bandas relacionadas aos grupos carboxilatos (COO⁻) na faixa de 1680-1500 cm⁻¹, reforçando a formação da coordenação. Analisando mais especificamente os bioCPs 5a, 5b e 6, observa-se na região de 3500-3000 cm⁻¹ a presença de bandas de alongamento médio característico do grupo NH de aminas primárias. Esse fenômeno destaca-se como uma evidência adicional da formação dos bioCPs, reforçando a interação específica entre o ligando e o íon metálico, além das modificações estruturais resultantes. Essas observações contribuem para uma compreensão mais aprofundada das transformações químicas ocorridas durante a síntese dos BioCPs.

4.3. Análises termogravimétricas dos bioCPs

A caracterização da estabilidade térmica dos filmes e dos bioCPs foi analisada através de termogravimetria (TGA). Esta é uma técnica que acompanha a perda e ou ganho de massa em função do tempo ou da temperatura, devido à oxidação ou perda de voláteis.

Começou-se por realizar as análises para os filmes de agarose e fécula dopados com os bioCPs 1 e 2. Entretanto, devido a problemas no equipamento, já não foi possível terminar as análises termogravimétricas para os filmes com os restantes bioCPs. Portanto, obteve-se apenas resultados para os filmes dopados com os bioCPs 1 e 2.

Na Figura 38 encontra-se representado os termogramas para os bioCPs 1 e 2.

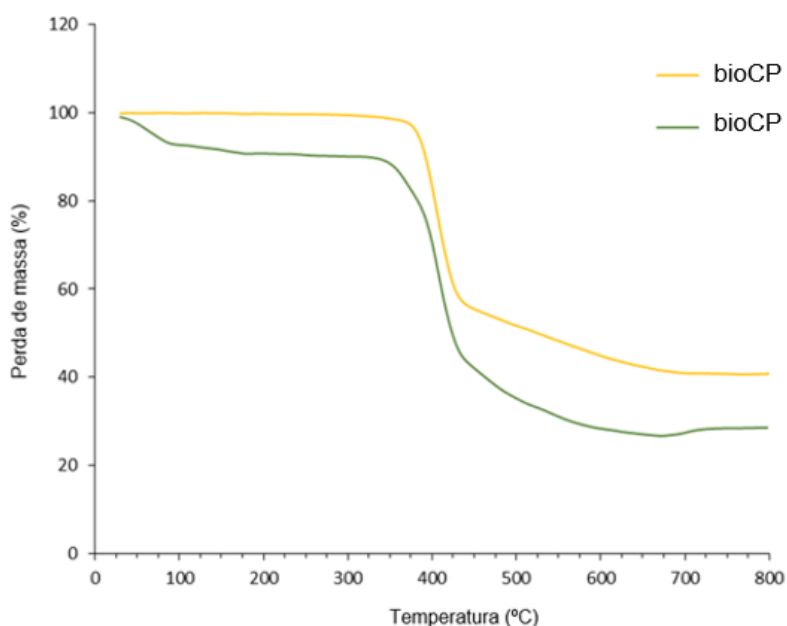


Figura 38 - Termograma (TGA) dos CPs 1 e 2.

As análises termogravimétricas dos bioCPs 1 e 2 mostram que para o bioCP 1 55% do peso perdido ocorre na faixa de 320-450 °C e conforme a temperatura aumenta para 700 °C mais 15% é perdido, permanecendo estável até os 800°C. Para o bioCP 2 um comportamento semelhante foi encontrado, sendo que, na faixa estudada (30-800 °C), o bioCP perdeu 70% da sua massa. A presença de prata(I) e cobre(II), em 1 e 2, respetivamente, justificam as tendências apresentadas.

Na Figura 39 encontra-se representado os termogramas para os filmes de agarose com os bioCPs 1 e 2.

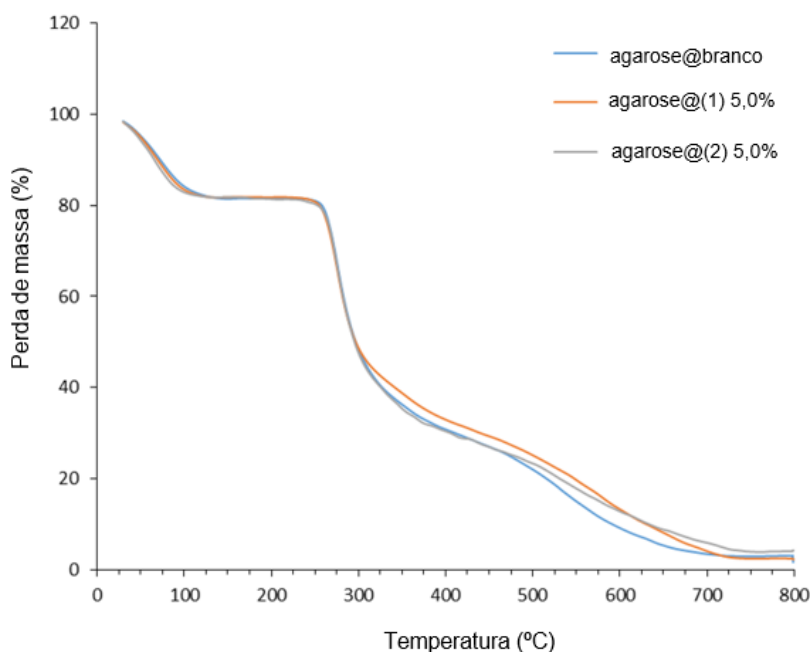


Figura 39 – Termogramas de agarose@branco, agarose@(1) 5,0% e agarose@(2) 5,0%.

Para os filmes de agarose, agarose@(1) e agarose@(2), os termogramas da Figura 39 seguem, geralmente, o mesmo padrão. A primeira redução de cerca de 18%, foi observada até 120 °C que está relacionada principalmente com a perda de água. À medida que a temperatura aumenta de 120 °C até 260 °C nenhuma alteração é observada. A 260 °C observa-se uma perda drástica de peso e 44% da massa, dos três filmes, é perdida na faixa de 260-350 °C. Os 38% restantes da massa são gradualmente perdidos de 350 °C a 800 °C, faixa em que os três termogramas são ligeiramente diferentes, com os filmes agarose@(1) 5,0% e agarose@(2) 5,0% ligeiramente estáveis depois o filme agarose@branco devido à presença dos bioCPs 1 e 2, respetivamente.

Na Figura 40 encontra-se representado os termogramas para os filmes de agarose com os bioCPs 1 e 2.

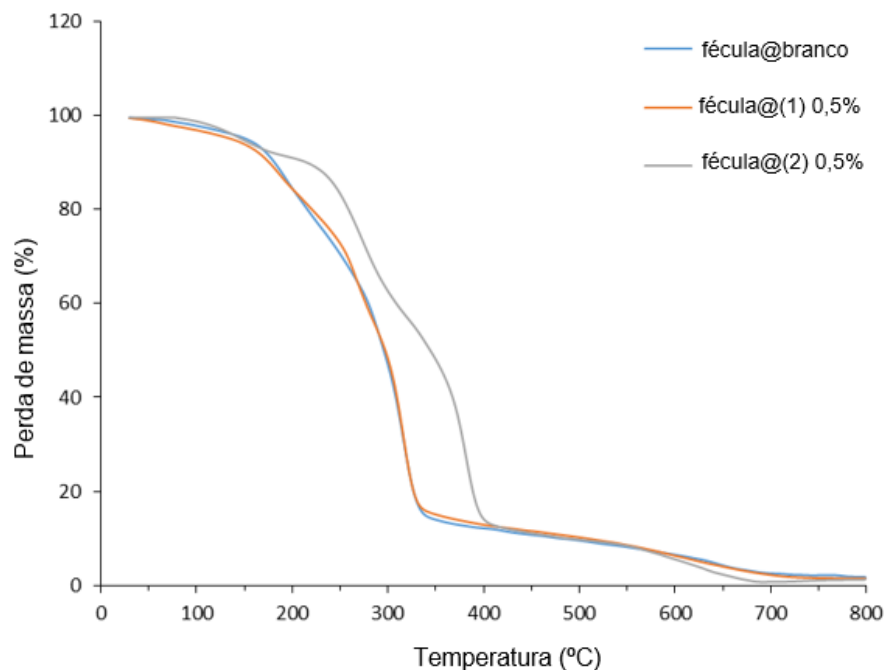


Figura 40 – Termogramas de fécula@branco, fécula@(1) 0,5% e fécula@(2) 0,5%.

Para os filmes fécula@branco, fécula@(1) 0,5% e fécula@(2) 0,5%, embora os termogramas TGA (Figura 40) sigam, geralmente, a mesma tendência, é evidente que o filme fécula@(2) 0,5% apresenta um leve atraso na fase drástica de perda de peso onde 75% da massa é perdida para os três filmes. Para os filmes fécula@branco e fécula@(2) 0,5% ocorre na faixa de 150 °C a 350 °C e no filme fécula@(2) 0,5% na faixa de 170 °C a 400 °C. A partir de 350 °C e 400 °C, respectivamente, até 800 °C pode-se observar a perda residual de 15% para os três filmes.

4.4. Testes microbiológicos

Com o objetivo de avaliar a capacidade antimicrobiana dos materiais produzidos foram realizados testes antimicrobianos de acordo com o descrito nos métodos experimentais. A análise efetuou-se através da mediação do halo de inibição (diâmetro onde não cresceram bactérias). Na Figura 41, apresenta-se como exemplo ilustrativo os resultados obtidos para os ensaios com filmes de agarose@(5a) 1,0%, agarose@(4) 1,0%, agarose@(4) 5,0% e agarose@Cu(NO₃)₂ 2,5%.

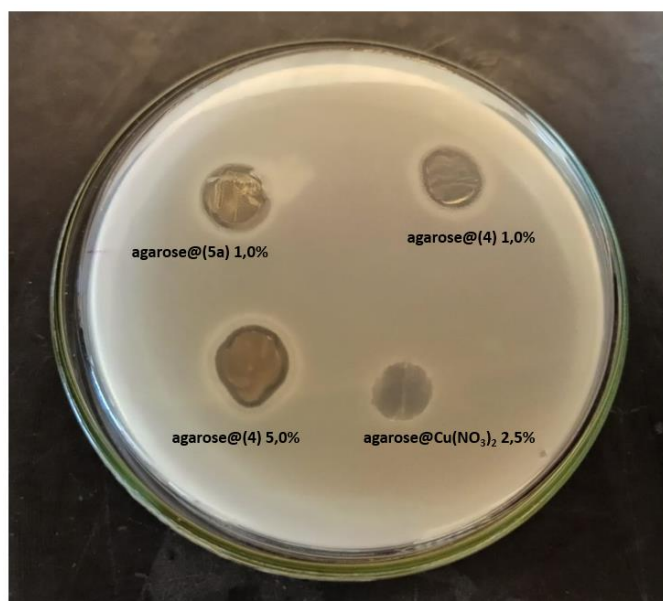


Figura 41 - Halos de inibição obtidos para os filmes agarose@(5a) 1,0%, agarose@(4) 1,0%, agarose@(4) 5,0% e agarose@Cu(NO₃)₂ 2,5%.

4.4.1. Filmes de agarose

Conforme descrito os filmes de agarose foram preparados com concentrações de dopagem de 1%, 2,5% e 5% dos diferentes bioCPs sintetizados, assim como dos ligandos e metais utilizados para a síntese desses bioCPs.

Os resultados obtidos apresentam-se da Figura 42 à 45.

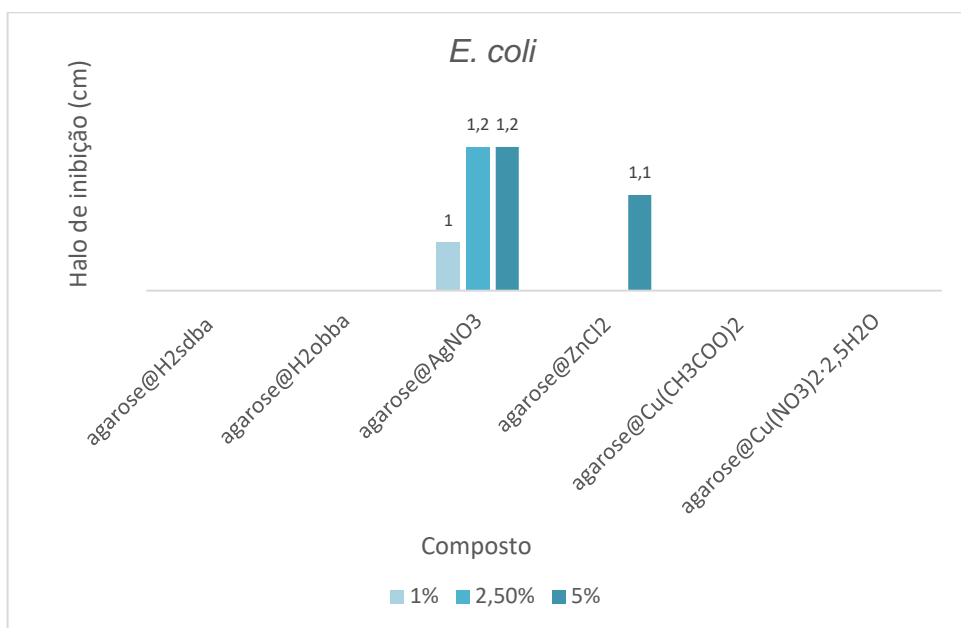


Figura 42 – Atividade antibacteriana de *E. coli* normalizada de filmes de biopolímero de agarose dopados com os ligandos e metais utilizados para a síntese dos bioCPs em estudo em diferentes percentagens (1, 2.5 e 5%).

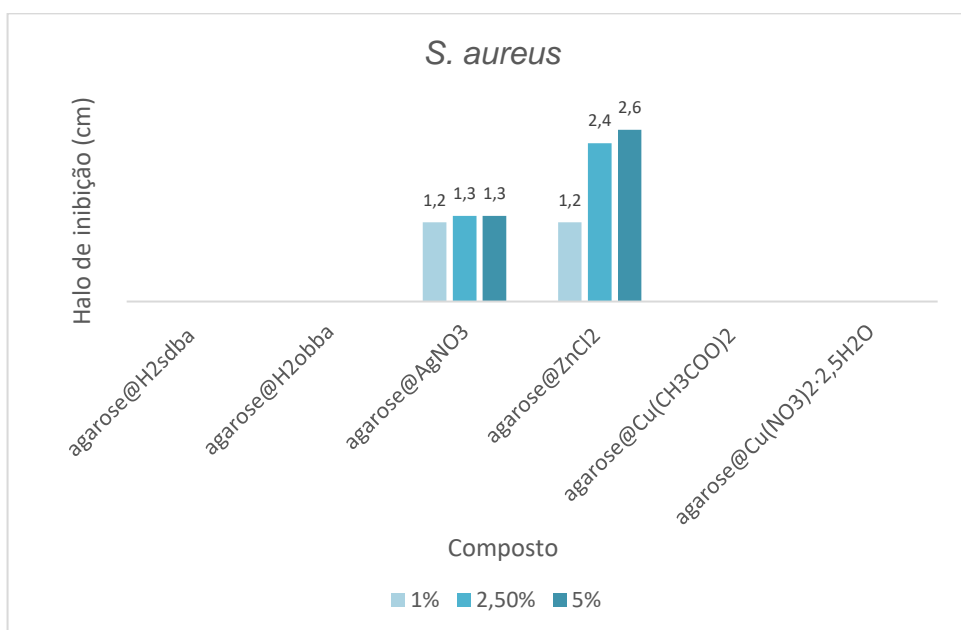


Figura 43 – Atividade antibacteriana de *S. aureus* normalizada de filmes de biopolímero de agarose dopados com os ligandos e metais utilizados para a síntese dos bioCPs em estudo em diferentes percentagens (1, 2.5 e 5%).

A análise dos gráficos nas Figuras 42 e 43 revela que os filmes de agarose@AgNO₃ e agarose@ZnCl₂ apresentam notável atividade antibacteriana tanto contra a bactéria *S. aureus* quanto contra a *E. coli*. Este resultado sugere que tanto o ião prata(I) quanto o ião zinco(II) possuem potencial para inibir o crescimento dessas duas estirpes bacterianas. Os filmes de

agarose@AgNO₃ exibiram halos de inibição de 1, 1.2 e 1.2 cm para a bactéria *E. coli*, e halos de inibição de 1.2, 1.3 e 1.3 cm para a bactéria *S. aureus*, nas concentrações de 1, 2.5 e 5%, respetivamente. Em contraste, o filme de agarose@ZnCl₂ a 5,0% apresentou um halo de inibição de 1.1 cm para a bactéria *E. coli*, sendo que, para as demais concentrações, não foram observados resultados de inibição. Entretanto, em relação à bactéria *S. aureus*, os halos de inibição foram consideráveis, com valores de 1.2, 2.4 e 2.6 cm para as concentrações de 1, 2.5 e 5%, respetivamente. Em contrapartida, os filmes contendo os ligandos H₂sdba e H₂obba, bem como os metais Cu(CH₃COO)₂ e Cu(NO₃)₂·2,5H₂O, não demonstraram atividade antibacteriana em relação às estirpes estudadas. Esses resultados evidenciam a seletividade na atividade antibacteriana dos filmes, sugerindo que a natureza química específica dos elementos e compostos utilizados influencia de maneira distinta a resposta antimicrobiana. Este é um aspecto crucial a ser considerado no desenvolvimento de materiais antibacterianos visando aplicações biomédicas e afins.

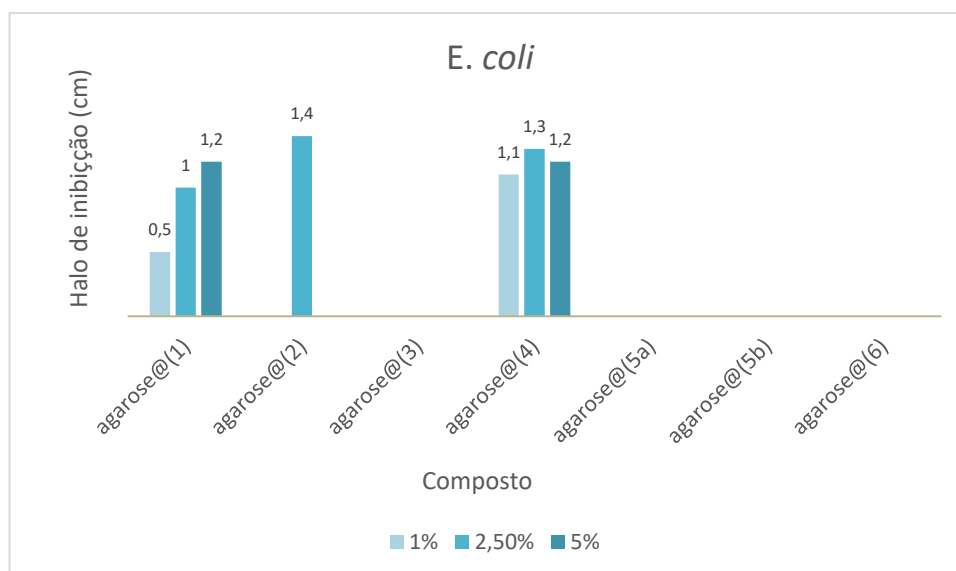


Figura 44 – Atividade antibacteriana de *E. coli* normalizada de filmes de biopolímero de agarose dopados com bioCPs em estudo em diferentes percentagens (1, 2.5 e 5%).

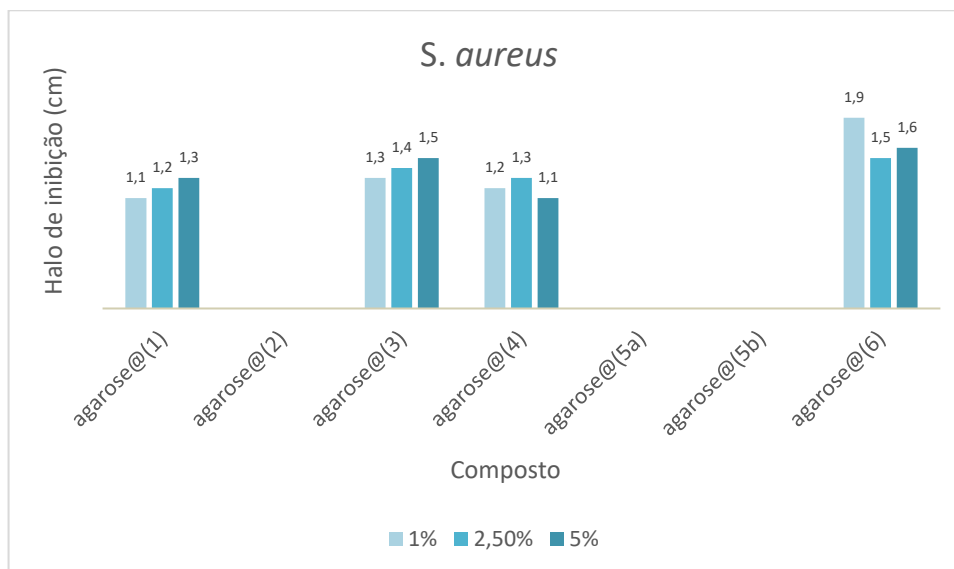


Figura 45 - Atividade antibacteriana de *S. aureus* normalizada de filmes de biopolímero de agarose dopados com bioCPs em estudo em diferentes percentagens (1, 2,5 e 5%).

A análise dos gráficos nas Figuras 44 e 45 revela que os filmes de agarose@(1) demonstram notável atividade antibacteriana frente às duas estirpes bacterianas sob investigação. Para a bactéria *E. coli*, observaram-se halos de inibição de 0,5, 1 e 1,2 cm, enquanto para a *S. aureus*, os halos foram de 1,1, 1,2 e 1,3 cm, nas concentrações de 1, 2,5 e 5%, respectivamente. O filme de agarose@(2) a 2,5% foi o único a exibir atividade antibacteriana, porém, somente contra a *E. coli*. Este resultado sugere a necessidade de repetição do ensaio, uma vez que os resultados obtidos carecem de coerência. Quanto aos filmes de agarose@(3), observou-se atividade antibacteriana exclusivamente contra a bactéria *S. aureus*, com halos de inibição de 1,3, 1,4 e 1,5 cm, nas concentrações mencionadas, respectivamente. Por outro lado, os filmes de agarose@(4) apresentaram atividade antibacteriana contra ambas as bactérias, resultando em halos de inibição de 1,1, 1,3 e 1,2 cm para *E. coli*, e 1,2, 1,3 e 1,1 cm para *S. aureus*, nas concentrações de 1, 2,5 e 5%. Em contraste, os filmes de agarose@(5a) e agarose@(5b) não demonstraram atividade antibacteriana para nenhuma das bactérias estudadas. Os filmes de agarose@(6), assemelhando-se aos de agarose@(3), inibiram exclusivamente a atividade bacteriana da *S. aureus*, com halos de inibição de 1,9, 1,5 e 1,6 cm, nas concentrações de 1, 2,5 e 5%, respectivamente. Esses resultados sugerem que a composição específica dos biofilmes influencia de maneira distinta a atividade antibacteriana, destacando a complexidade dos mecanismos de interação entre os filmes e as bactérias em estudo.

A análise dos resultados revela que os filmes à base de bioCPs de prata(I) exibem atividade antibacteriana contra ambas as cepas bacterianas, sendo este metal particularmente eficaz contra a bactéria *E. coli*. Por outro lado, os filmes dopados com bioCPs de zinco(II)

demonstram uma inibição seletiva, apresentando atividade antibacteriana exclusivamente contra a *S. aureus*. Além disso, destaca-se que os halos de inibição observados são mais expressivos nos filmes contendo bioCPs de zinco(II) em comparação com os de prata(I). Os filmes à base de bioCPs de cobre(II) não apresentam atividade antibacteriana para nenhuma das estirpes estudadas. Embora tenha sido obtido um resultado positivo para o filme de agarose@2 a 2.5%, é necessário repetir o ensaio para confirmar a sua validade. Essa ressalva evidencia que os filmes contendo cobre(II) são os menos eficazes na inibição da atividade bacteriana. A escolha do ligando não parece influenciar significativamente os resultados, uma vez que os bioCPs contendo os ligandos H₂sdba ou H₂obba na sua composição demonstram atividade antibacteriana quando incorporados nos filmes de agarose. Entretanto, os filmes de agarose apenas dopados com o ligando não apresentam inibição da atividade bacteriana. Em resumo, para a matriz de agarose, os filmes mais eficazes foram os de agarose@4 contra *E. coli* e de agarose@6 contra *S. aureus*, ambos contendo bioCPs com o ligando H₂obba em sua estrutura. Esses resultados fornecem *insights* valiosos sobre a influência dos diferentes metais e ligandos na atividade antibacteriana dos filmes, sendo essencial considerar esses aspectos na formulação de materiais antimicrobianos.

4.4.2. Filmes de fécula de batata

Conforme descrito os filmes de fécula de batata foram preparados com concentrações de dopagem de 0.10, 0.25 e 0.50% dos diferentes bioCPs sintetizados, assim como dos ligandos e metais utilizados para a síntese desses bioCPs.

Os resultados obtidos apresentam-se da Figura 46 à 49.

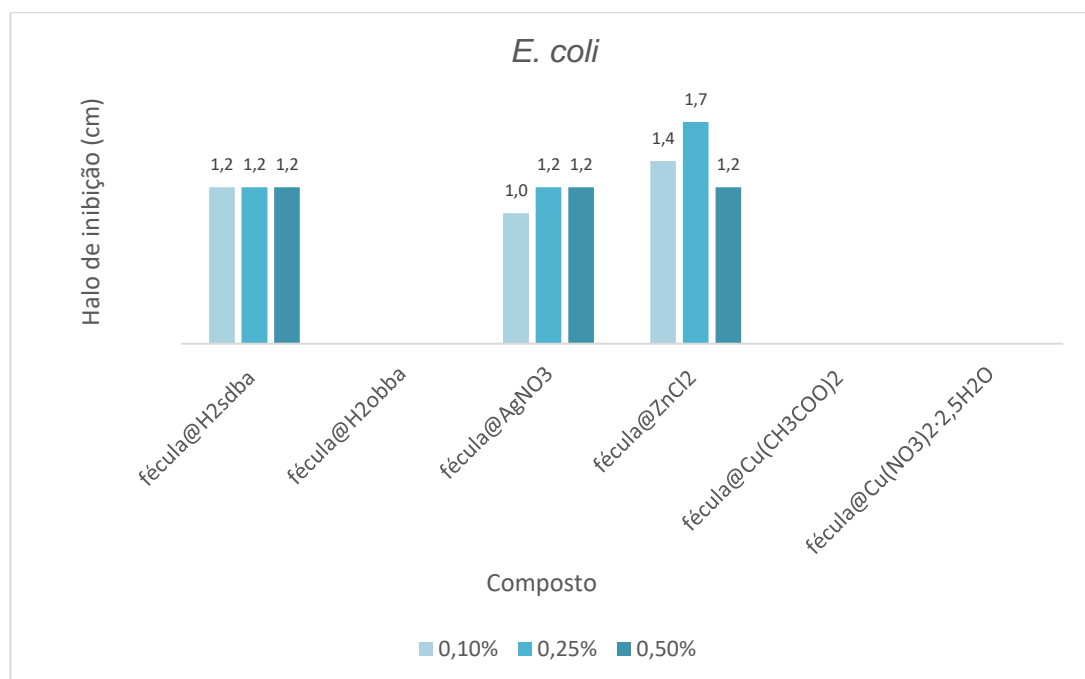


Figura 46 – Atividade antibacteriana de *E. coli* normalizada de filmes de biopolímero de fécula de batata dopados com os ligandos e metais utilizados para a síntese dos bioCPs em estudo em diferentes percentagens (0.10, 0.25 e 0.50%).

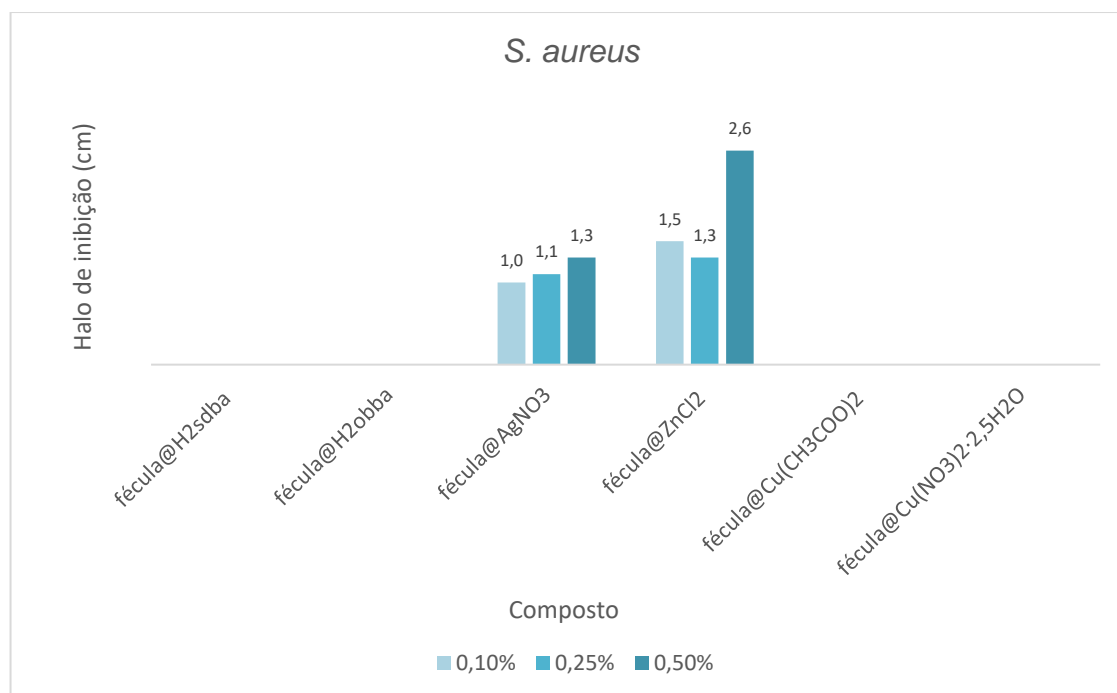


Figura 47 – Atividade antibacteriana de *S. aureus* normalizada de filmes de biopolímero de fécula de batata dopados com os ligandos e metais utilizados para a síntese dos bioCPs em estudo em diferentes percentagens (0.10, 0.25 e 0.50%).

Pelas Figuras 46 e 47, observa-se que dos dois ligandos em estudo, apenas H₂sdba integrado em matriz de fécula de batata, apresentou atividade antibacteriana, e foi para a bactéria *E.coli*, apresentando halos de inibição de 1.2 cm para as concentrações de 0.10, 0.25 e 0.50%.

Já para os filmes dopados com sais metálicos, apenas os filmes à base de bioCPs de prata(I) e de zinco(II) apresentaram atividade antibacteriana. Os filmes de fécula à base de bioCPs de cobre(II), tal como para a agarose, não tiveram nenhum efeito na atividade bacteriana das bactérias em estudo.

Os filmes de fécula@AgNO₃ apresentaram atividade antibacteriana para ambas as bactérias, tendo-se obtido os halos de inibição de 1, 1.2 e 1.2 cm para a bactéria *E. coli* e de 1, 1.1 e 1.3 para a bactéria *S. aureus*, para as concentrações referidas, respetivamente.

Os filmes de fécula@ZnCl₂ apresentaram atividade antibacteriana para ambas as bactérias, tendo-se obtido os halos de inibição de 1.4, 1.7 e 1.2 cm para a bactéria *E. coli* e de 1.5, 1.3 e 2.6 cm para a bactéria *S. aureus*, para as concentrações referidas, respetivamente.

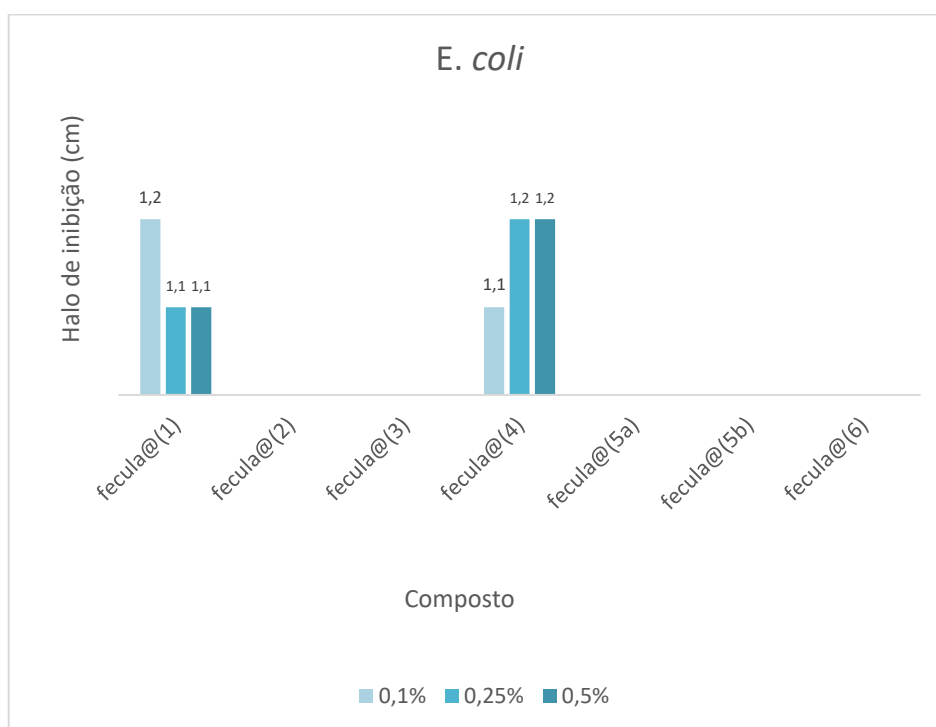


Figura 48 – Atividade antibacteriana de *E. coli* normalizada de filmes de biopolímero de fécula de batata dopados com bioCPs em estudo em diferentes percentagens (0.10, 0.25 e 0.50%).

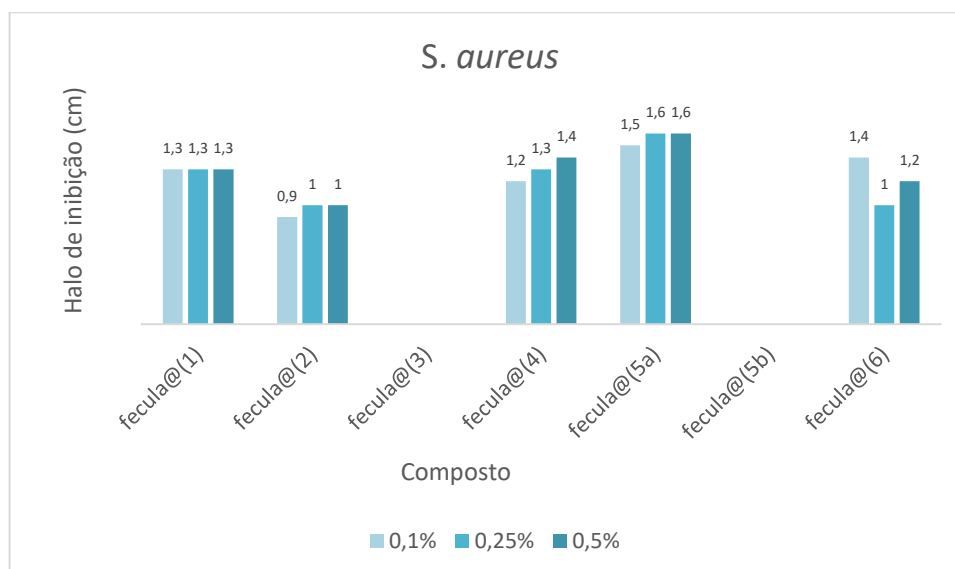


Figura 49 - Atividade antibacteriana de *S. aureus* normalizada de filmes de biopolímero de fécula de batata dopados com bioCPs em estudo em diferentes percentagens (0,10, 0,25 e 0,50%).

Ao analisar os gráficos nas Figuras 48 e 49, evidencia-se que os filmes de fécula@(1) apresentam significativa atividade antibacteriana frente a ambas as estirpes bacterianas em estudo. Observaram-se halos de inibição de 1,2; 1,1 e 1,1 cm para *E. coli*, nas concentrações de 0,10; 0,25 e 0,50%, respetivamente. Para *S. aureus*, o halo de inibição foi de 1,3 cm, mantendo-se consistente em todas as concentrações avaliadas.

O filme de fécula@(2) apresentou atividade antibacteriana para apenas para a bactéria *S. aureus*, tendo-se obtido halos de inibição de 0,9, 1 e 1 cm, para as concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, respetivamente, enquanto, os filmes de fécula@(3) não apresentaram capacidade de inibir a atividade bacteriana de nenhuma das bactérias.

Já os filmes de fécula@(4) apresentaram atividade antibacteriana para as duas bactérias, tendo-se obtido halos de inibição de 1,1, 1,2 e 1,2 cm para *E. coli*, e 1,2, 1,3 e 1,4 cm para *S. aureus*, para as concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, respetivamente.

Os filmes de fécula@(5a) revelaram atividade antibacteriana exclusivamente contra *S. aureus*, apresentando halos de inibição de 1,5; 1,6 e 1,6 cm para concentrações de 0,10; 0,25 e 0,50%, respetivamente. Já os filmes de fécula@(5b) não demonstraram capacidade de inibir a atividade de nenhuma das bactérias avaliadas. Por sua vez, os filmes de fécula@(6) apenas inibiram a atividade bacteriana contra *S. aureus*, resultando em halos de inibição de 1,4, 1 e 1,2 cm para a mesma faixa de concentrações.

Verifica-se que os filmes de fécula à base de bioCPs de prata(I) tiveram atividade antibacteriana para ambas as bactérias em estudo. Os filmes de fécula à base de bioCPs de cobre(II) tiveram resultados positivos apenas na inibição da atividade de *S. aureus*. Já os filmes de fécula@ZnCl₂ apresentam atividade antibacteriana para as bactérias *E. coli* e *S.*

aureus, no entanto, os filmes à base de bioCPs de zinco(II) já não tiveram a capacidade de inibir a atividade bacteriana de *E. coli*. Isto demonstra que filmes de sais de zinco(II) poderão ter capacidade de inibir a atividade bacteriana de *E. coli*, no entanto filmes de bioCPs de zinco(II), devido ao facto de terem uma taxa de libertação de iões Zn^{2+} mais lenta, poderão não proporcionar à matriz de fécula a concentração necessária para inibir a atividade da bactéria *E. coli*.

Conclui-se que para a matriz de fécula, os filmes que apresentaram melhores resultados foram os de fécula@(5a) para *E. coli*, e de fécula@(6) para *S. aureus*, ambos os filmes com bioCPs de ligandos H_2obba na sua estrutura.

Os valores utilizados para a construção dos gráficos de barras encontram-se no ANEXO II, nas tabelas 6 e 7.

4.5. Testes citotóxicos

A liberação gradual de íons metálicos por biodegradação de estruturas proporciona um efeito antibacteriano tanto para bactérias Gram-Positivas como Gram-negativas. No entanto, a citotoxicidade dos bioCPs é de enorme importância.

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade dos materiais produzidos foram realizados testes de citotoxicidade conforme descrito nos métodos experimentais. A análise baseou-se nas leituras de absorvância obtidas a 490 nm, as quais, pela Equação 1 (quantificação da citotoxicidade (%)) dos materiais), traduziram a citotoxicidade dos materiais em avaliação. A atividade da enzima LDH, libertada para o meio quando há danos na membrana plasmática das células, foi determinada pela subtração dos valores de absorvância a 680 nm (referência) pelos valores de absorvância a 490 nm.

$$\% \text{ Citotóxicidade} = \frac{\text{Atividade de LDH tratada com composto} - \text{Atividade LDH espontânea}}{\text{Atividade de LDH máxima} - \text{Atividade de LDH espontânea}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

sendo que a atividade de LDH máxima corresponde ao valor obtido da lise máxima.

Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Valores de citotoxicidade obtidos para cada ensaio do bioCP 1.

Amostra	Citotoxicidade (%)
Fécula@branco	-8,22
Fécula@branco <i>transwell insert</i>	-4,47
Fécula@(1)	-8,66
Fécula@(1) <i>transwell insert</i>	10,45
Agarose@branco	5,61
Agarose@branco <i>transwell insert</i>	-5,30
Agarose@(1)	-29,50
Agarose@(1) <i>transwell insert</i>	2,02
BioCP 1	-40,06
BioCP 1 <i>transwell insert</i>	-6,71

Tabela 3 - Valores de citotoxicidade obtidos para cada ensaio do bioCP 2.

Amostra	Citotoxicidade (%)
Fécula@(2)	-15,30
Fécula@(2) <i>transwell insert</i>	-6,30
Agarose@(2)	-10,02
Agarose@(2) <i>transwell insert</i>	0,28
BioCP 2	-20,10
BioCP 2 <i>transwell insert</i>	-19,87

Verifica-se que tanto o bioCP 1 como o bioCP 2 não são citotóxicos, nem quando se encontram isolados nem integrados nas matrizes poliméricas em estudo, visto que os valores de citotoxicidade foram muito baixos, sendo alguns negativos.

No entanto, os filmes de agarose apresentaram valores de citotoxicidade ligeiramente superiores aos filmes de fécula de batata. O mesmo se aplica para o bioCP 1, tem uma citotoxicidade ligeiramente superior ao bioCP 2.

5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

Este trabalho explora o conceito de empregar dois biopolímeros modelo, cada um com permeabilidade e estabilidade distintas, para a geração de materiais que possuam taxas de libertação de iões Ag^+ , Cu^{2+} e Zn^{2+} variadas, mesmo utilizando o mesmo tipo de dopante.

Ao analisar a atividade antibacteriana contra *S. aureus*, observou-se que os filmes mais eficazes foram aqueles compostos por agarose@ ZnCl_2 e fécula@ ZnCl_2 . No entanto, esses filmes apresentam uma vida útil menor devido à taxa de libertação de iões Zn^{2+} para as matrizes de agarose ou fécula de batata ser mais elevada. Esse fenómeno é atribuído à fragilidade das ligações no sal ZnCl_2 em comparação com quando o zinco(II) está ligado a um ligando orgânico. Neste último caso, a libertação de iões Zn^{2+} ocorre de maneira mais lenta, conferindo uma vantagem significativa em termos de estabilidade do material. Esta observação ressalta a importância da escolha do biopolímero e da natureza do dopante na formulação de materiais com propriedades específicas de libertação de iões para aplicações antibacterianas.

Portanto, os resultados mais promissores para cada tipo de filme contra *S. aureus* foram os filmes de agarose@(6) e fécula@(5a), ambos contendo o ligando H_2obba e à base de zinco(II) e cobre(II), respetivamente. Em relação à *E. coli*, os filmes à base de bioCPs de prata(I) destacaram-se na bioatividade, nomeadamente, agarose@(1), agarose@(4), fécula@(1) e fécula@(4), sendo os filmes de bioCP 1 com o ligando H_2sdba e os de bioCP 4 com o ligando H_2obba . Ambos os bioCPs são à base de prata(I).

Quanto à variação da concentração de dopagem nos filmes produzidos, não foi possível identificar uma tendência clara, pois os halos de inibição variaram de forma desproporcional com a concentração de bioCP integrado na matriz. Em conclusão, filmes à base de bioCPs de prata(I) em agarose e fécula de batata demonstraram a capacidade de inibir a atividade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, indicando o seu potencial como agentes antimicrobianos. Filmes à base de bioCPs de cobre(II) apenas têm bioatividade quando integrados em matriz de fécula de batata, e têm a capacidade de inibir a atividade de *S. aureus*, ou seja, tem inibição seletiva por bactérias Gram-negativas. E por fim, filmes de agarose e de fécula de batata à base de bioCPs de zinco(II) têm a capacidade de inibir a atividade de *S. aureus*, ou seja, também tem inibição seletiva por bactérias Gram-negativas.

Com base nos resultados obtidos e considerando que apenas os filmes de bioCPs 1 e 2 foram testados quanto à citotoxicidade, este estudo conclui que os filmes à base de bioCP 1, contendo prata(I), apresentam a inibição mais promissora. Esses filmes demonstraram atividade antibacteriana eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de não manifestarem citotoxicidade para células humanas. Por outro lado, os filmes de bioCP 2, embora também não tenham evidenciado citotoxicidade, não foram tão eficazes na inativação da atividade bacteriana.

Como perspectiva futura, pretende-se realizar estudos de citotoxicidade para os filmes de bioCPs 4 e 6. Isso deve-se ao fato de que os filmes, tanto de fécula quanto de agarose, contendo esses compostos, apresentarem uma bioatividade significativa. Essas investigações adicionais permitirão uma compreensão mais abrangente dos aspectos de segurança e eficácia desses filmes, contribuindo para o desenvolvimento de materiais antimicrobianos mais avançados e seguros.

Este estudo revelou uma perspectiva altamente promissora para a aplicação de bioCPs como alternativa ao uso de antibióticos, tanto para o tratamento quanto para a prevenção de filmes antimicrobianos. Além disso, proporcionou uma abordagem pouco explorada na aplicação de CPs/MOFs para a inibição de filmes, destacando a eficácia na fabricação de filmes de biopolímeros antibacterianos a partir de matérias-primas de base biológica acessíveis. Futuras investigações, focadas em aspectos como durabilidade e tempo de vida, podem aprimorar a avaliação de CPs bioativos e filmes de biopolímeros derivados como candidatos promissores para o tratamento de infecções bacterianas. Além disso, a avaliação da citotoxicidade desses materiais é crucial. A capacidade desses filmes em revestir dispositivos médicos e tratar infecções cutâneas também merece investigação. Adicionalmente, seria interessante examinar a possível aquisição de resistência por parte das bactérias aos bioCPs ao longo de gerações sucessivas. Essas considerações contribuem para a compreensão mais abrangente e aplicada dos CPs como agentes antimicrobianos inovadores e seguros.

6. Referências Bibliográficas

- [1] – Zhou, Q., et al. (2020) Syntheses, structures and properties of three novel Cu(II) coordination compounds based on 4,4'-oxybisbenzoic acid, *Journal of Molecular Structure*, 1-6.
- [2] – McCoy, F., (1981) Observations in fouling biofilm formation, *Can. J. Microbiol.*, 27, 9-17.
- [3] – Cabeen, T., Jacobs, C. (2005) Bacterial cell shape. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3(8), 601-610.
- [4] – Scott, R., Barnett, C. (2006) Surface proteins of gram-positive bacteria and how they get there, *Annu Rev. Microbiol.*, 60, 397-423.
- [5] – Lowy, F. (1998) *Staphylococcus aureus* Infections, *N. Engl. J. Med.*, 339, 520-532.
- [6] – Santos, L., et al. (2007) *Staphylococcus aureus* visiting a strain of clinical importance, *J Bras Patol e Med Lab.*, 43(6), 413-423.
- [7] – Gould, M., et al. (2012) New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance, *Int. J. Antimicrob Agents.*, 39(2), 96-104.
- [8] – Baba, T., et al. (2004) The *staphylococcus aureus* genome, *Staphylococcus aureus Mol. Clin. Asp.*, 114(12), 66-153.
- [9] – Torgersen, H., et al. (2000) Antimicrobial resistance: the example of *S. aureus*, *J. Biolaw Bus.*, 3(3), 53-59.
- [10] - Hardy, J., et al. (2004) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill, *Br. J. Anaesth.*, 92(1), 121-130.
- [11] – Hajipour, J., et al. (2012) Antibacterial properties of nanoparticles, *Trends Biotechnol.*, 30(10), 499-511.
- [12] – Dias, T., et al. (2010) Avaliação da sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões, *Ciência e Tecnol. Aliment.*, 30(2), 319-324.
- [13] – Magnabosco, C., et al. (2018) The biomass and biodiversity of the continental subsurface, *Nat. Geosci.*, 11, 707–717.
- [14] – Schrenk, O., et al. (2010) Microbial provinces in the subseafloor, *Annu. Rev. Mar. Sci.*, 2, 279–304.

- [15] – Guimarães, O., et al. (2010) Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes, *Química Nova*, 33(3), 667-679.
- [16] – Feng, Q., et al. (2000) A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Biomed. Mater. Res.*, 52(4), 662–668.
- [17] – Urus, S., et al. (2005) Synthesis, characterization, and antimicrobial activities of Cu(I), Ag(I), Au(I), and Co(II) complexes with [CH₃N(CH₂PPh₂)₂], *Heteroat. Chem.*, 16, 484–491.
- [18] – Beobide, G., et al. (2013) Metal-carboxylato-nucleobase systems: from supramolecular assemblies to 3D porous materials, *Coord. Chem. Rev.*, 257(20), 2716-2736.
- [19] – Tamyris, T. (2012) Síntese, caracterização e estudo das propriedades magnéticas de um polímero de coordenação contendo cobalto(II) e cobre(II), *Química Nova*, 35(9), 1776-1781.
- [20] – Batten, S., R. (2012) Coordination polymers, metal–organic frameworks and the need for terminology guidelines, *Crystengcomm*, 14, 3001.
- [21] – Chen, W., et al. (2018) Synthesis, functionalization, and applications of metal–organic frameworks in biomedicine, *Dalton Trans.*, 47, 2114-2133.
- [22] – Zhang, S., et al. (2019) Synthesis, structure and antibacterial activity of a copper(II) coordination polymer based on thiophene-2,5-dicarboxylate ligand, *Polyhedron*, 166, 130-136.
- [23] – Serment-Guerrero, J., et al. (2017) Genotoxic assessment of the copper chelated compounds Casiopeinas: Clues about their mechanisms of action, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 166, 68-75.
- [24] – Bera, P., et al. (2019) An unusual iminoacylation of 2-amino pyridyl thiazole: Synthesis, X-ray crystallography and DFT study of copper(II) amidine complexes and their cytotoxicity, DNA binding and cleavage study, *Polyhedron*, 159, 436-445.
- [25] – Wang, D., et al. (2019) Synthesis, characterization and antibacterial activity of Zn(II) coordination polymer, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 194, 153-159.
- [26] – Wyszogrodzka, G., et al. (2016) Metal-organic frameworks: mechanisms of antibacterial action and potential applications, *Drug Discovery Today*, 21(6), 1009-1018.
- [27] – Stuart R. et al. (2013) Terminology of metal–organic frameworks and coordination polymers, *Pure Appl. Chem.*, 85(8), 1715-1724.

- [28] – Dantas, R. A., et al. (2014) Redes metalorgânicas e suas aplicações em catálise, *Revista Química Nova*, 37(1), 123-133.
- [29] – Liu, J., et al. (2007) Experimental and Theoretical Studies of Gas Adsorption in $\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$: An Effective Activation Procedure, *J. Phys. Chem.*, 111(26), 9305-9313.
- [30] – Klinowski, J., et al. (2011) Microwave-assisted synthesis of metal-organic frameworks, *Dalt Trans.*, 40(2), 321-330.
- [31] – Giménes, M., et al. Nanostructured metal–organic frameworks and their bio-related applications. *Coord. Chem. Rev.*, v. 307, p. 342-360, 2016.
- [32] – Carne, A., et al. (2011) Nanoscale metal-organic materials. *Chem. Soc. Rev.* 40, 291–305.
- [33] – Cejka, J., et al. (2007) Introduction to zeolite science and practice, *Studies in Surface science and catalysis*, 168(10), 331 - 333.
- [34] – Ian, R., et al. (2018), Two structurally diverse Zn-based coordination polymers with excellent antibacterial activity, *CrystEngComm*, 20, 3353-3362.
- [35] – Wang, S., et al. (2019) Integration of adsorption and photosensitivity capabilities into a cationic multivariate metal-organic framework for enhanced visible-light photoreduction reaction, *Appl. Catal. B Environ.*, 2019, 253, 323–330.
- [36] – Abdul, R., et al. (2019) Synthesis, structure and antibacterial activity of a copper(II) coordination polymer based on thiophene-2,5-dicarboxylate ligand, *Polyhedron*, 166, 130-136.
- [37] – Qin, Z. (2021) Versatile roles of silver in Ag-based nanoalloys for antibacterial applications, *Coord. Chem. Rev.*, 449, 214-218.
- [38] – Kim, K., et al. (2012) Graphene oxide sheath on Ag nanoparticle/graphene hybrid films as an antioxidative coating and enhancer of surface-enhanced Raman scattering, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 4, 6545–6551.
- [39] – Fromm, M. (2013) Silver coordination compounds with antimicrobial properties, *Appl. Organomet. Chem.*, 27, 683–687.
- [40] – Du, M. (2012) Design and Construction of Coordination Polymers with Mixed-Ligand Synthetic Strategy, *Coordination Chemistry Reviews*, 1-87.

- [41] – Hu, F. L., Yin, X. H. (2012) Synthesis, crystal structures and properties of Cu(II) and Cd(II) complexes with 4,4'-oxybis(benzoic acid), *Inorganic Chemistry Communications*, 15, 256-260.
- [42] – Nitta, E., et al. (2008) Crystal chemistry of ZnS minerals formed as high-temperature volcanic sublimates: matraite identical with sphalerite, *Journal of Mineralogical and Petrological Sciences*, 103(2), 145-151.
- [43] – Li, X. X., et al. (2011) A New Lanthanide Coordination Polymer with 4,4'-Oxybis (Benzoic Acid) Ligand: Hydrothermal Synthesis, Crystal Structure and Photoluminescence, *J. Chem. Crystallogr.*, 41, 757-761.
- [44] – Nassar, H. N., et al. (2018) Antimicrobial activities of green synthesized Ag nanoparticles@Ni-MOF nanosheets, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, 28, 2791–2798.
- [45] – Eckhardt, S., et al. (2013) Its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine, *Chem.*, 113, 4708–4754.
- [46] – Jaros, W., et al. (2014) Aliphatic dicarboxylate directed assembly of silver (I) 1, 3, 5-triaza-7-phosphaadamantane coordination networks: Topological versatility and antimicrobial activity, *Cryst. Growth Des.*, 14, 5408–5417.
- [47] – Chen, H., et al. (2016) Preparation, characterization, and properties of chitosan films with cinnamaldehyde nanoemulsions, *Food Hydrocoll.*, 61, 662–671.
- [48] – Zhang, Y., et al. (2018) Hydrophobicity and physicochemical properties of agarose film as affected by chitosan addition, *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 1307-1313.
- [49] – Ghasemzadeh, H., et al. (2021) Antimicrobial chitosan-agarose full polysaccharide silver nanocomposite films, *International Journal of Biological Macromolecules*, 179, 532-541.
- [50] – Onofre-Cordeiro, N., et al. (2018) Agarose-silver particles films: Effect of calcium ascorbate in nanoparticles synthesis and film properties, *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 71-707.
- [51] – Gonzalez-Gutierrez, J., et al. (2010) Development of highly-transparent protein/starch-based bioplastics, *Bioresource Technology*, 101, 2007-2013.
- [52] – Podshivalov, A., et al. (2017) Gelatin/potato starch edible biocomposite films: Correlation between morphology and physical properties, *Carbohydrate Polymers*, 157, 1162-1172.

- [53] – Dupuis, J., Liu, Q. (2019) Potato Starch: a Review of Physicochemical, Functional and Nutritional Properties, *American Journal of Potato Research*, 96, 127-138.
- [54] – Karabet, F., et al. (2017) On the Plasticization Process of Potato Starch: Preparation and Characterization, *Food Biophysics*, 12, 397-403.
- [55] – Hockett, L., Baltrus, A. (2017) Use of the Soft-agar Overlay Technique to Screen for Bacterially Produced Inhibitory Compounds, *Jove Journal*, 119.
- [56] – Fernandes, A., et al. (2021) Silver(I) Coordination Polymers Immobilized into Biopolymer Films for Antimicrobial Applications, *ACS Appl. Mater Interfaces*, 13(11), 12836-12844.
- [57] – Huang, C., et al. (2014) Seven dicarboxylate-based coordination polymers with structural varieties and different solvent resistance properties derived from the introduction of small organic linkers, *CrystEngComm*, 13, 2615-2625.
- [58] – Zhou, Q., et al. (2020) Syntheses, structures and properties of three novel Cu(II) coordination compounds based on 4,4'-oxybisbenzoic acid, *Journal of Molecular Structure*, 1206, 127688.

7. Anexos

ANEXO I – Tabelas elaboradas com as percentagens de bioCP adicionado na produção de cada filme.

Tabela 4 - Massas de bioCPs utilizadas para a produção de cada Filme de agarose e respetiva percentagem de dopagem.

Filme de agarose	BioCP adicionado	Dopagem (%)	Massa de bioCP adicionado (mg)
agarose@(1)	1	1,00	2,00
		2,50	5,00
		5,00	10,00
agarose@(2)	2	1,00	1,80
		2,50	4,50
		5,00	9,00
agarose@(3)	3	1,00	1,68
		2,50	4,20
		5,00	5,00
agarose@(4)	4	1,00	1,96
		2,50	4,90
		5,00	9,80
agarose@(5a)	5a	1,00	1,40
		2,50	3,50
		5,00	7,00
agarose@(5b)	5b	1,00	1,40
		2,50	3,50
		5,00	7,00
agarose@(6)	6	1,00	1,52
		2,50	3,80
		5,00	7,40

Tabela 5- Massas de bioCPs (polímeros de coordenação) utilizadas para a produção de cada filme de amido de batata e respetiva percentagem de dopagem.

Filme de amido de batata	BioCP adicionado	Dopagem (%)	Massa de bioCP adicionado (mg)
fécula@(1)	1	0,10	2,00
		0,25	5,00
		0,50	10,00
fécula@(2)	2	0,10	1,80
		0,25	4,50
		0,50	9,00
fécula@(3)	3	0,10	1,68
		0,25	4,20
		0,50	5,00
fécula@(4)	(4)	0,10	1,96
		0,25	4,90
		0,50	9,80
fécula@(5a)	5a	0,10	1,40
		0,25	3,50
		0,50	7,00
fécula@(5b)	5b	0,10	1,40
		0,25	3,50
		0,50	7,00
fécula@(6)	6	0,10	1,52
		0,25	3,80
		0,50	7,40

Anexo II – Tabelas referentes aos halos de inibição obtidos nos testes microbiológicos para as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Tabela 6 - Halos de inibição obtidos nos testes microbiológicos para as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, em filmes de agarose.

Filme de agarose	Halo de inibição (cm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
agarose@H ₂ sdba 1,0%	-	-
agarose@H ₂ sdba 2,5%	-	-
agarose@H ₂ sdba 5,0%	-	-
agarose@H ₂ obba 1,0%	-	-
agarose@H ₂ obba 2,5%	-	-
agarose@H ₂ obba 5,0%	-	-
agarose@AgNO ₃ 1,0%	1,2	1
agarose@AgNO ₃ 2,5%	1,3	1,2
agarose@AgNO ₃ 5,0%	1,3	1,2
agarose@ZnCl ₂ 1,0%	1,2	-
agarose@ZnCl ₂ 2,5%	2,4	-
agarose@ZnCl ₂ 5,0%	2,6	1,1
agarose@Cu(CH ₃ COO) ₂ 1,0%	-	-
agarose@Cu(CH ₃ COO) ₂ 2,5%	-	-
agarose@Cu(CH ₃ COO) ₂ 5,0%	-	-
agarose@Cu(NO ₃) ₂ ·2,5H ₂ O 1,0%	-	-
agarose@Cu(NO ₃) ₂ ·2,5H ₂ O 2,5%	-	-
agarose@Cu(NO ₃) ₂ ·2,5H ₂ O 5,0%	-	-
agarose@(1) 1,0%	1,1	0,5
agarose@(1) 2,5%	1,2	1
agarose@(1) 5,0%	1,3	1,2
agarose@(2) 1,0%	-	-
agarose@(2) 2,5%	-	1,4
agarose@(2) 5,0%	-	-
agarose@(3) 1,0%	1,3	-
agarose@(3) 2,5%	1,4	-
agarose@(3) 5,0%	1,5	-
agarose@(4) 1,0%	1,2	1,1
agarose@(4) 2,5%	1,3	1,3
agarose@(4) 5,0%	1,1	1,2
agarose@(5a) 1,0%	-	-
agarose@(5a) 2,5%	-	-
agarose@(5a) 5,0%	-	-
agarose@(5b) 1,0%	-	-
agarose@(5b) 2,5%	-	-
agarose@(5b) 5,0%	-	-
agarose@(6) 1,0%	1,9	-
agarose@(6) 2,5%	1,5	-
agarose@(6) 5,0%	1,6	-

Tabela 7 - Halos de inibição obtidos nos testes microbiológicos para as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, em filmes de amido de batata.

FFilme de amido de batata	Halo de inibição (cm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
fécula@H ₂ sdba 0,10%	-	1,2
fécula@H ₂ sdba 0,25%	-	1,2
fécula@H ₂ sdba 0,50%	-	1,2
fécula@H ₂ obba 0,10%	-	-
fécula@H ₂ obba 0,25%	-	-
fécula@H ₂ obba 0,50%	-	-
fécula@AgNO ₃ 0,10%	1	1
fécula@AgNO ₃ 0,25%	1,1	1,2
fécula@AgNO ₃ 0,50%	1,3	1,2
fécula@ZnCl ₂ 0,10%	1,5	1,4
fécula@ZnCl ₂ 0,25%	1,3	1,7
fécula@ZnCl ₂ 0,50%	2,6	1,2
fécula@Cu(CH ₃ COO) ₂ 0,10%	-	-
fécula@Cu(CH ₃ COO) ₂ 0,25%	-	-
fécula@Cu(CH ₃ COO) ₂ 0,50%	-	-
fécula@Cu(NO ₃) ₂ ·2,5H ₂ O 0,10%	-	-
fécula@Cu(NO ₃) ₂ ·2,5H ₂ O 0,25%	-	-
fécula@Cu(NO ₃) ₂ ·2,5H ₂ O 0,50%	-	-
fécula@(1) 0,10%	1,3	1,2
fécula@(1) 0,25%	1,3	1,1
fécula@(1) 0,50%	1,3	1,1
fécula@(2) 0,10%	0,9	-
fécula@(2) 0,25%	1	-
fécula@(2) 0,50%	1	-
fécula@(3) 0,10%	-	-
fécula@(3) 0,25%	-	-
fécula@(3) 0,50%	-	-
fécula@(4) 0,10%	1,2	1,1
fécula@(4) 0,25%	1,3	1,2
fécula@(4) 0,50%	1,4	1,2
fécula@(5a) 0,10%	1,5	-
fécula@(5a) 0,25%	1,6	-
fécula@(5a) 0,50%	1,6	-
fécula@(5b) 0,10%	-	-
fécula@(5b) 0,25%	-	-
fécula@(5b) 0,50%	-	-
fécula@(6) 0,10%	1,4	-
fécula@(6) 0,25%	1	-
fécula@(6) 0,50%	1,2	-

Anexo III - Espectros de FTIR-ATR para os bioCPs, para os filmes de agarose e amido de batata, e para os filmes de agarose e amido de batata dopados com os bioCPs.

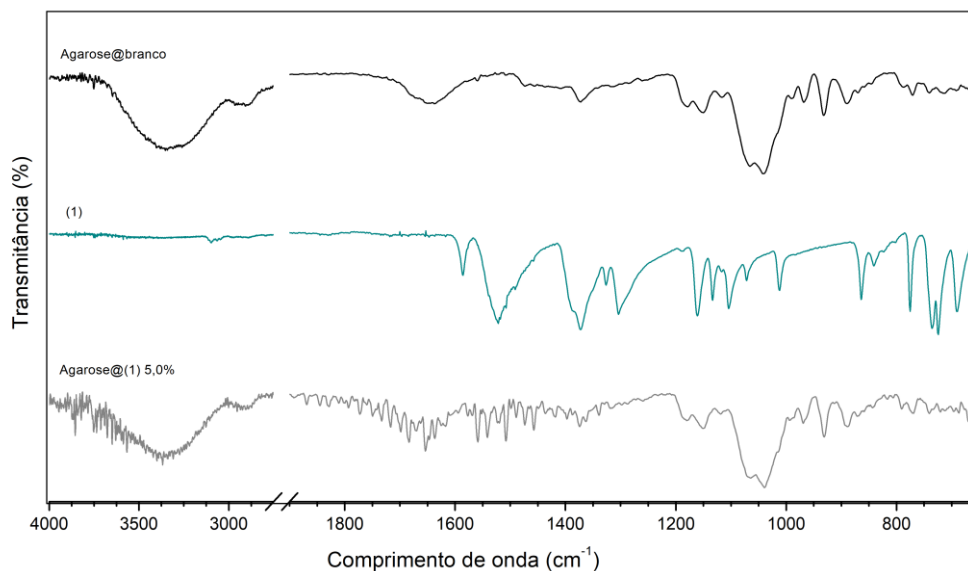


Figura 50 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 1, para o filme de agarose branco e para o filme de agarose dopado com o bioCP 1 (5%).

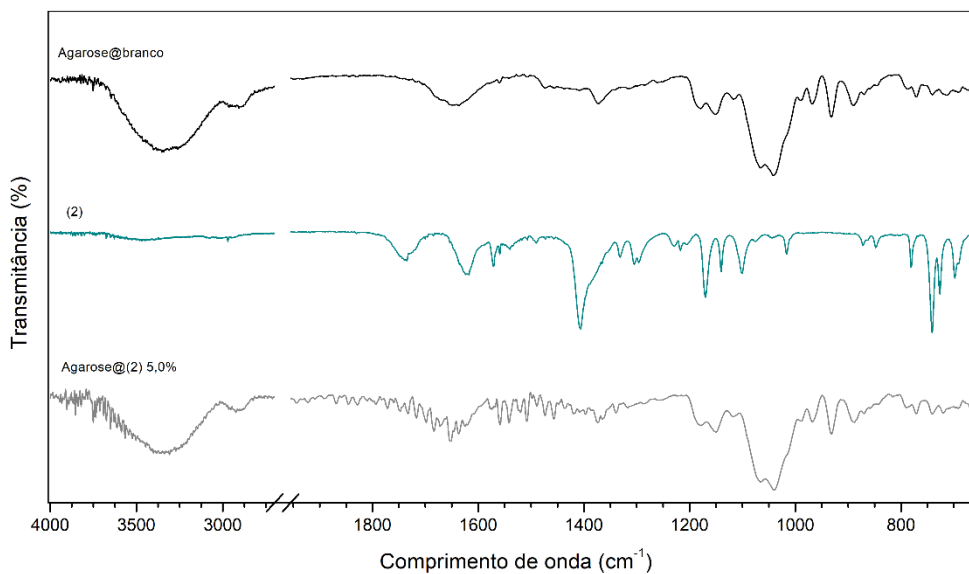


Figura 51 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 2, para o filme de agarose branco e para o filme de agarose dopado com o bioCP 2 (5%).

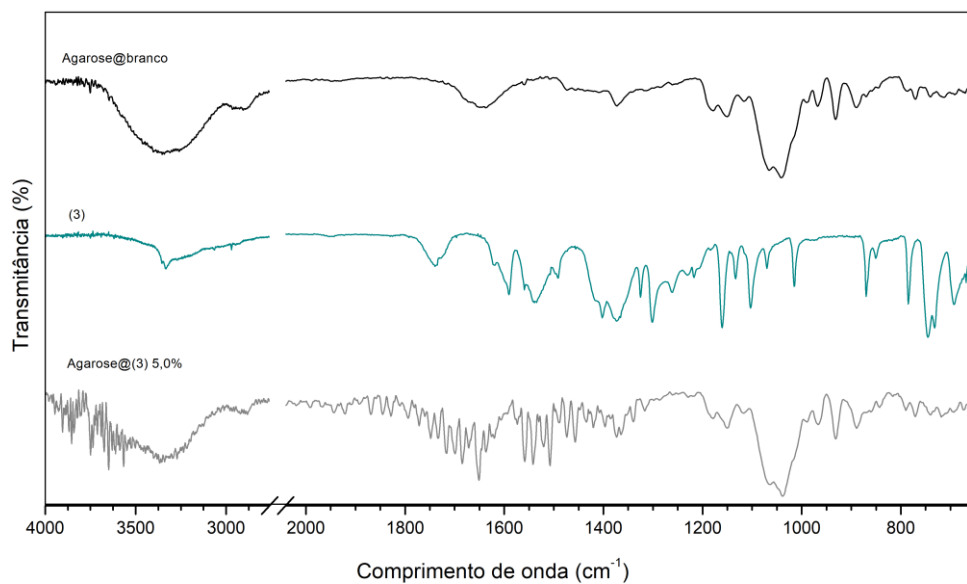


Figura 52 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 3, para o filme de agarose branco e para o filme de agarose dopado com o bioCP 3 (5%).

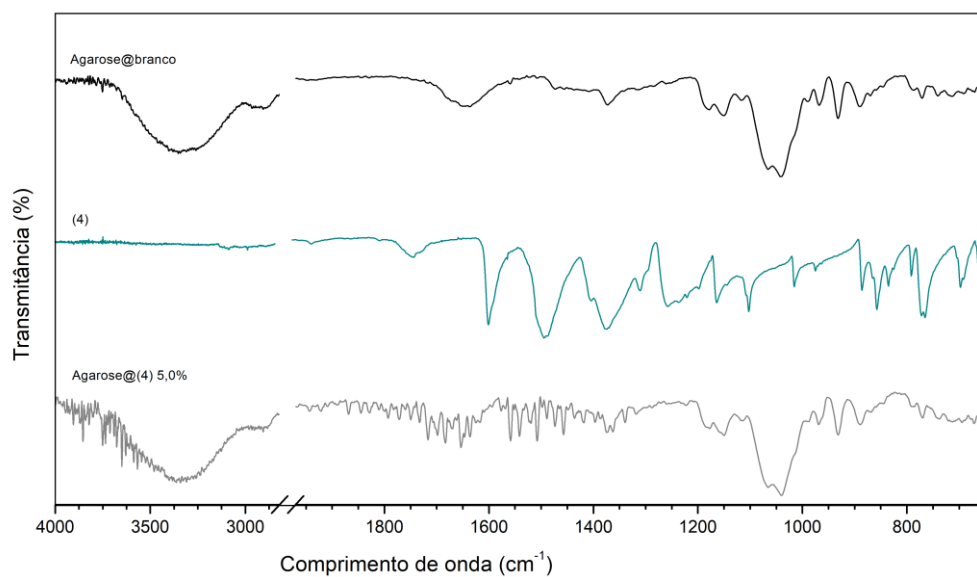


Figura 53 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 4, para o filme de agarose branco e para o filme de agarose dopado com o bioCP 4 (5%).

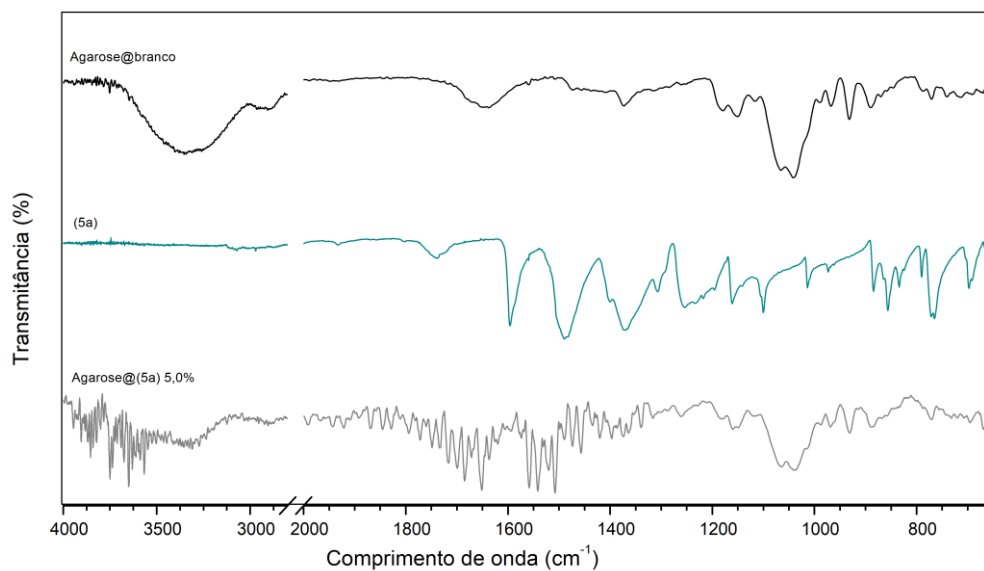


Figura 54 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 5a, para o filme de agarose branco e para o filme de agarose dopado com o bioCP 5a (5%).

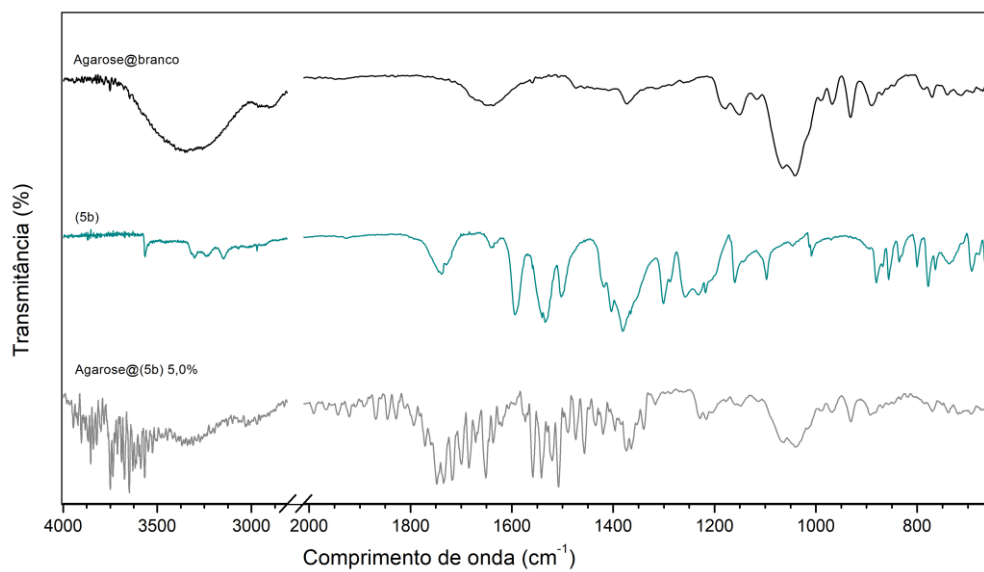


Figura 55 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 5b, para o filme de agarose branco e para o filme de agarose dopado com o bioCP 5b (5%).

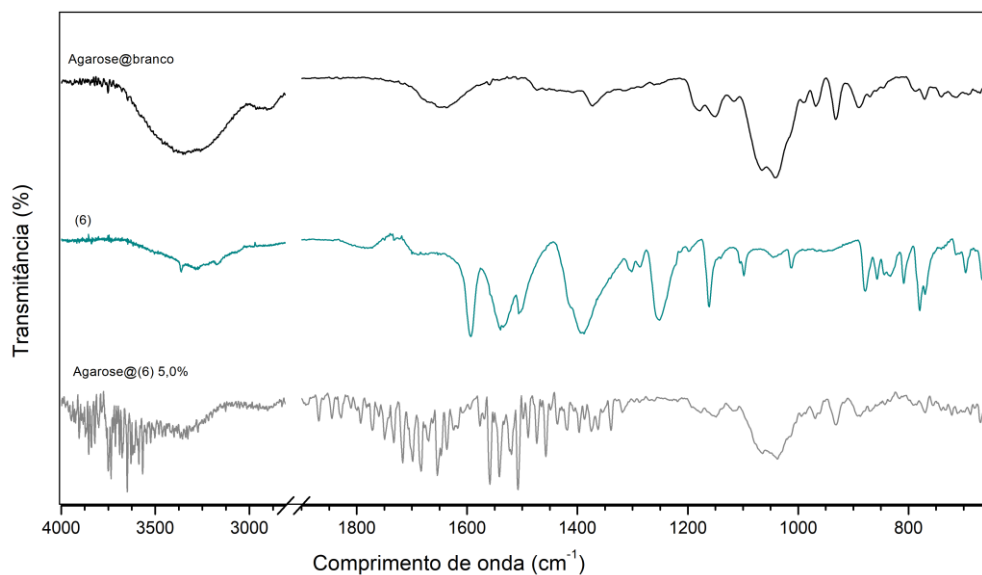


Figura 56 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 6, para o filme de agarose branco e para o filme de agarose dopado com o bioCP 6 (5%).

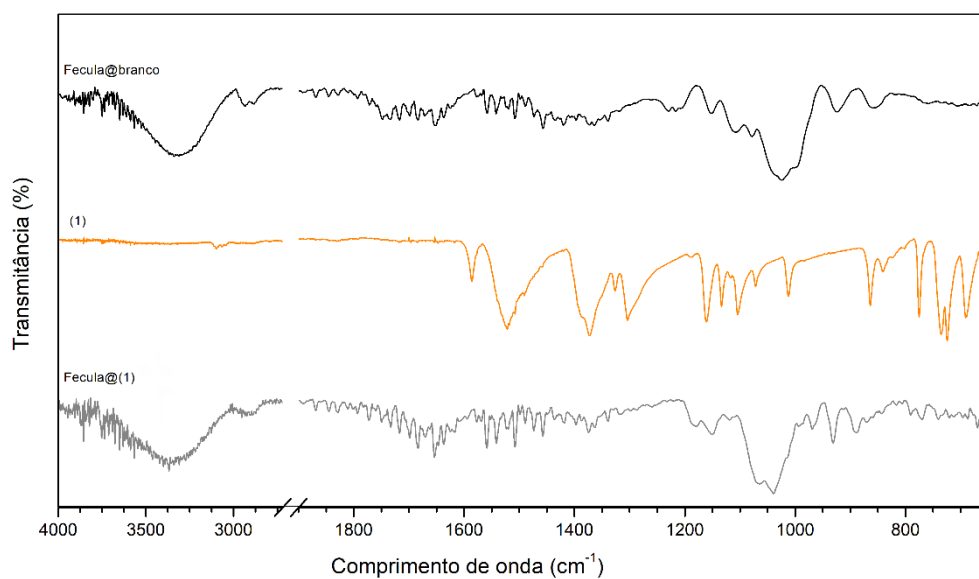


Figura 57 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 1, para o filme de fécula branco e para o filme de fécula dopado com o bioCP 1 (0,5%).

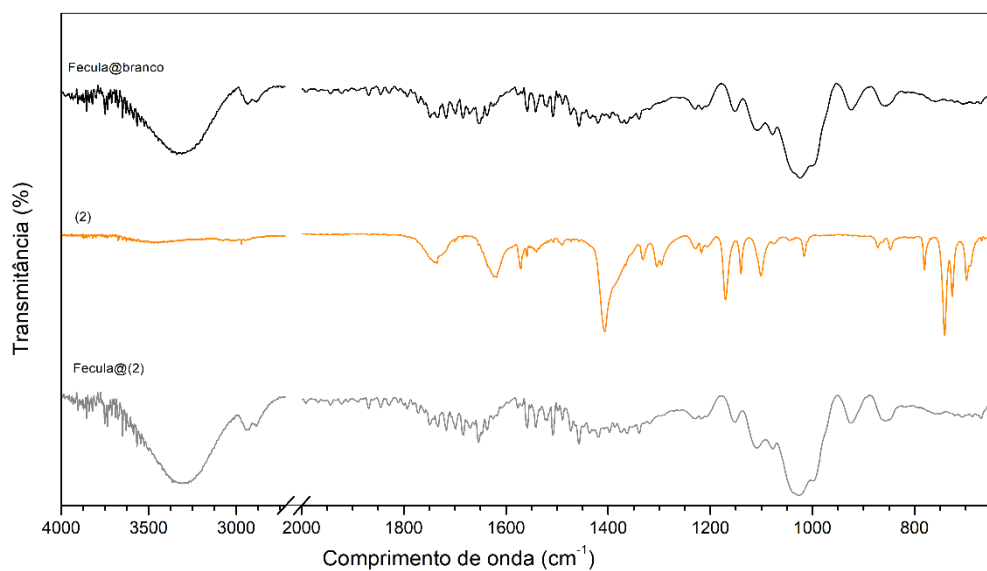


Figura 58 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 2, para o filme de fécula branco e para o filme de fécula dopado com o bioCP 2 (0,5%).

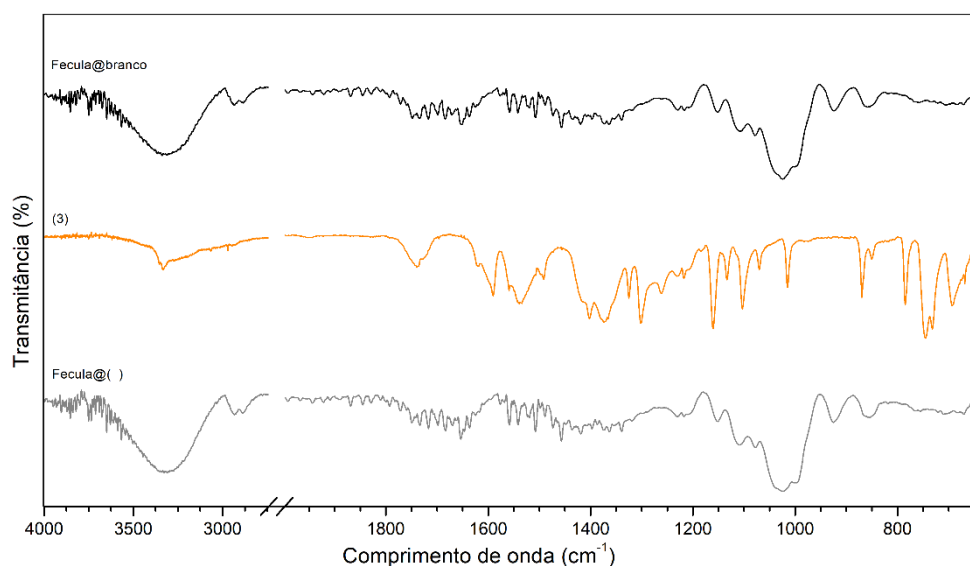


Figura 59 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 3, para o filme de fécula branco e para o filme de fécula dopado com o bioCP 3 (0,5%).

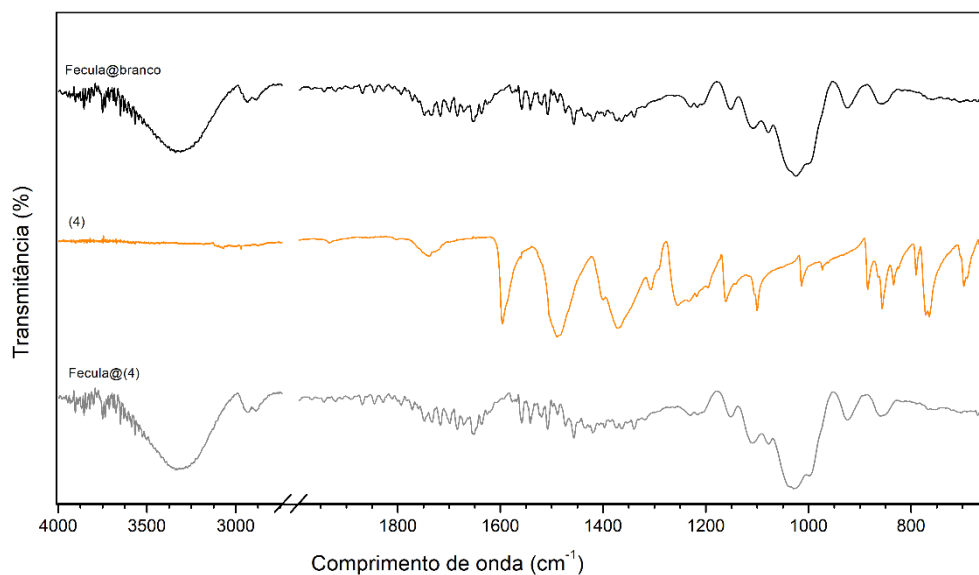


Figura 60 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 4, para o filme de fécula branco e para o filme de fécula dopado com o bioCP 4 (0,5%).

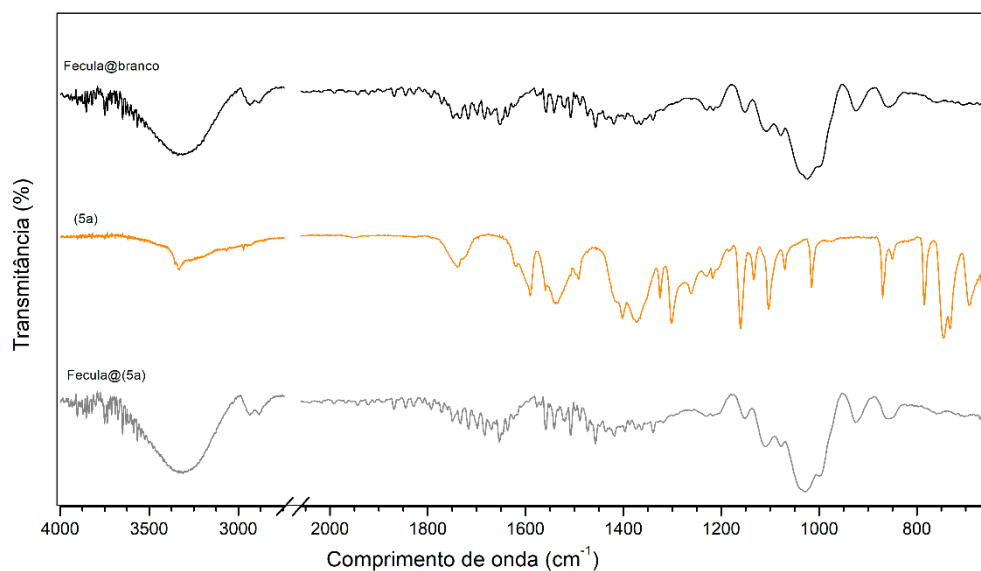


Figura 61 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 5a, para o filme de fécula branco e para o filme de fécula dopado com o bioCP 5a (0,5%).

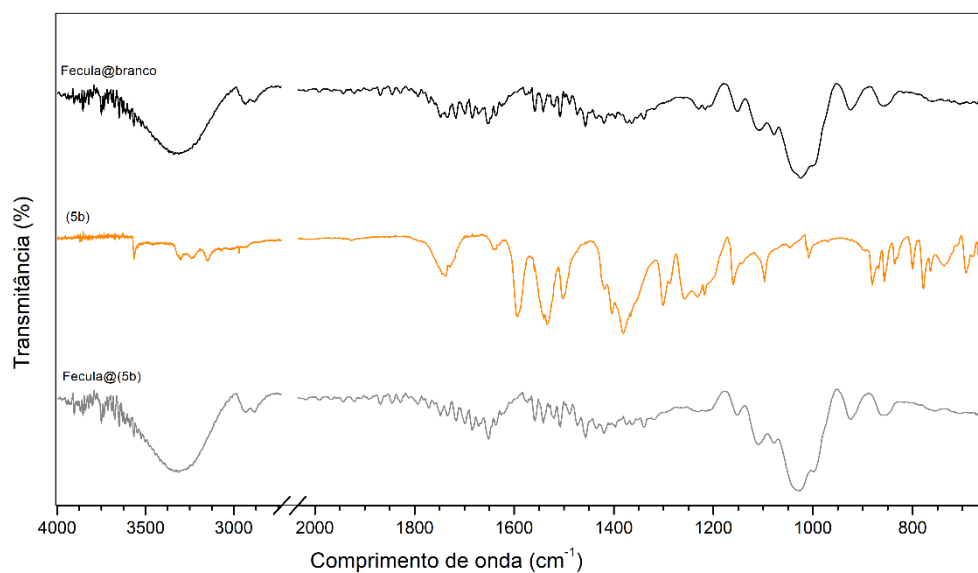


Figura 62 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 5b, para o filme de fécula branco e para o filme de fécula dopado com o bioCP 5b (0,5%).

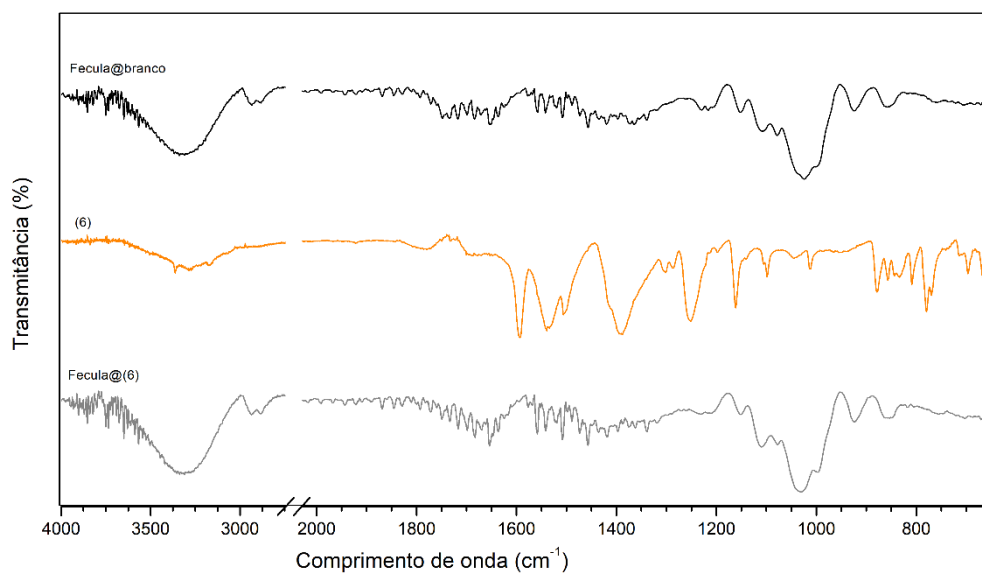


Figura 63 - Espectros de FTIR-ATR para o bioCP 6, para o filme de fécula branco e para o filme de fécula dopado com o bioCP 6 (0,5%).