



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química Fundamental
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais

Aline de Andrade Alves

**CELULOSE BACTERIANA MICROCRISTALINA MODIFICADA: DE
CURATIVOS A FILTROS BACTERIANOS**

Recife
2019

Aline de Andrade Alves

**CELULOSE BACTERIANA MICROCRISTALINA MODIFICADA: DE
CURATIVOS A FILTROS BACTERIANOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutor em Ciência de Materiais.

Área de Concentração: Materiais não Metálicos

Orientadores:

Prof. Dr. André Galembeck

Prof. Dr.^a Mônica Freire Belian

Recife

2019

Catálogo na fonte
Bibliotecária Arabelly Ascoli CRB4-2068

A474c Alves, Aline de Andrade
 Celulose bacteriana microcristalina modificada: de curativos a
 filtros bacterianos / Aline de Andrade Alves. – 2019.
 116 f.: il. fig., tab.

 Orientadores: André Galembeck, Mônica Freire Belian
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
 CCEN. Ciência de Materiais. Recife, 2019.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1. Celulose bacteriana. 2. Filtração microbiológica. 3. Curativos
 antimicrobianos. 4. Nanopartículas de prata. I. Galembeck, André.
 (orientador). II. Belian, Mônica Freire. (orientadora). III. Título.

 620.19 CDD (22. ed.) UFPE-CCEN 2020-58

Aline de Andrade Alves

**CELULOSE BACTERIANA MICROCRISTALINA MODIFICADA: DE
CURATIVOS A FILTROS BACTERIANOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciência de Materiais.

Aprovado em: 14/08/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. André Galembeck (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Thayza Christina Montenegro Stamford (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Glória Maria Vinhas (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. André Fernando Lavorante (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Maria Goreti Carvalho Pereira (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

**Dedico esse trabalho a minha amada família em especial a minha mãe Amparo
e ao meu esposo Júnior.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a santíssima virgem Maria por todo amor e toda providência derramada em minha vida nesse tempo de espera para a concretização desse trabalho.

Aos meus orientadores Prof. Dr^a. Mônica Belian e Prof^o Dr. André Galembeck por terem confiado em mim, pelos valiosos ensinamentos e exigências, obrigada por todo tempo dedicado a esse trabalho.

Aos meus pais Amparo e Luis, minhas irmãs Priscylla e Kalina e ao meu esposo Júnior que foram as pessoas que me ajudaram financeiramente e emocionalmente não permitindo que eu desistisse. Amo-os mais que tudo nessa vida!

Aos meus amigos Suzana, Filipe, Diogo, Sthefanny, Celinha, Samuel, Larissa, César, Ana Paula, Thiago e Cícero que foram bálsamo nessa trajetória, com sorrisos, orações, acolhimento e muita alegria me impulsionaram até a reta final. A Ana Santino e Leda que com muito carinho me aconselharam e me acolheram com amor maternal.

A Rozy, meu porto seguro, sem a sua ajuda profissional eu não teria prosseguido, minha gratidão por você e pela sua profissão será eterna.

Ao Prof. Dr. Wagner Eduardo da Silva pelas ricas contribuições.

A professora Thayza Stamford, professora do departamento de medicina tropical, por ter cedido seu laboratório para a realização dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos.

Aos meus colegas da UFRPE em especial Nayara, Lidiane, Amanda, Carine, Natanny, Heliana e Renê muito obrigada por tudo. As amigas antigas do laboratório Elaine, Paulo, Thiago e Rômulo que sempre torceram por mim.

Aos meus colegas do CETENE que tornaram meus dias mais leves: Joselma (pela amizade sincera e partilha diária, sentirei muitas saudades), Túlio, Patrícia, Carol e Kate (vocês tornaram a hora do almoço um momento especial, sentirei falta das nossas risadas). A Isaac e Aldenise por todo apoio técnico, a Telma que sempre foi solícita as minhas necessidades, vocês foram muito importantes nessa jornada.

Aos meus colegas de turma do doutorado e ao programa de pós-graduação em ciência de materiais da UFPE por todo aprendizado nesse período.

Aos colegas do CHICO (Laboratório de Coloides e materiais híbridos) Yollice, Miguel, Krystal e Clara pela receptividade e pelas medidas de microscopia eletrônica de varredura, Lucas e Mônica pela alegria e acolhimento.

Ao CENAPESQ (UFRPE), Central analítica (UFPE) e CETENE pelas caracterizações realizadas nessa tese.

Ao CPRH na pessoa do Newton que viabilizou as coletas e análises das amostras das bacias hidrográficas do rio Igarassu e Jaboatão.

A FACEPE pela bolsa concedida.

RESUMO

A celulose bacteriana (CB), produzida a partir da biossíntese da *Gluconacetobacter xylinus*, possui características únicas como, alta estabilidade térmica e mecânica, alta capacidade de absorção de água, é hipoalergênica, biocompatível e biodegradável possuindo grande versatilidade em aplicações biotecnológicas. A utilização da CB na constituição de novos materiais foi utilizada para a produção de uma membrana para filtração de micro-organismos e um curativo com propriedades antimicrobianas. As membranas filtrantes foram produzidas a partir da modificação da celulose com sílica, apresentando excelente capacidade filtrante para suspensões de *Escherichia coli* na ordem de 10^8 células/mL. Os experimentos de filtração foram realizados tanto para as suspensões de *E. coli* quanto para amostras reais coletadas na bacia hidrográfica de Jaboaão e Igarassu, que possui maior complexidade microbiológica. Os resultados mostraram que as membranas produzidas possuem maior poder filtrante do que membranas comerciais compostas por ésteres de celulose utilizada para filtração esterilizante. Esse é o primeiro trabalho que estuda a capacidade filtrante de materiais constituídos por celulose bacteriana para filtração de *E. coli*, abrindo novas perspectivas para o tratamento de água e efluente. Para a produção do curativo, foi realizada a modificação da CB com 3-aminopropil-trimetoxissilano (APTS), 3-2-aminoetilamino-propil-trimetoxissilano (DPTS) e N-3-trimetoxissililpropil-dietilenotriamina (TPTS) seguido da inserção de nanopartículas de prata *in situ*. Os grupos aminos adicionados as membranas ancoram as nanopartículas de prata impedindo a sua liberação descontrolada. Os compósitos apresentaram ação antimicrobiana comprovada a partir do teste de disco-difusão para bactérias comumente encontradas em infecções epiteliais (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermides*).

Palavras-Chave: Celulose Bacteriana. Filtração Microbiológica. Curativos Antimicrobianos. Nanopartículas de Prata.

ABSTRACT

The bacterial cellulose (CB), produced from the biosynthesis of *Gluconacetobacter xylinus*, has unique characteristics such as high thermal and mechanical stability, high water absorption capacity, hypoallergenic, biocompatible and biodegradable, with great versatility in biotechnological applications. The use of CB in the constitution of new materials was used in this thesis for the production of a membrane for filtration of microorganisms and dressing with antimicrobial properties. The filter membranes were produced from the cellulose modification with silica, exhibiting excellent filtering capacity for *Escherichia coli* suspensions in the order of 10^8 cells/ml. The filtration experiments were performed for both the *E. coli* suspensions and the actual samples collected in the Igarassu watershed, which has a higher microbiological complexity. The results showed that the membranes produced have higher filtering power than commercial membranes composed of cellulose esters used for sterilizing filtration. This is the first work that studies the filtering capacity of bacterial cellulose materials for filtration of *E. coli*, opening new perspectives for the treatment of water and effluent. For the production of the dressing, the CB was modified with aminopropyl trimethoxysilane (APTS), 3-2-aminoethyl amino-propyl-trimethoxysilane (DPTS) and N-3-trimethoxysilylpropyl diethylenetriamine (TPTS) silylates followed by the insertion of nanoparticles of silver in situ. The amine groups added to the membranes anchor the silver nanoparticles to prevent their uncontrolled release. The composites presented a proven topical antimicrobial action from the disc-diffusion test for bacteria commonly found in epithelial infections (*E. coli*, *P. aeruginosas*, *S. aureus*, *S. epidermides*).

Keywords: Bacterial Cellulose. Microbiological filtration. Antimicrobial dressings. silver nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01-	Estrutura química da celulose.....	20
Figura 02-	Imagem de microscopia eletrônica de varredura da <i>Gluconacetobacter xylinus</i> durante a produção da celulose bacteriana.....	21
Figura 03-	Biossíntese da celulose utilizando glicose e glicerol como substrato.....	24
Figura 04-	Mecanismo de produção da celulose bacteriana catalisada pela enzima celulose sintase.....	24
Figura 05-	Microscopia eletrônica de transmissão da <i>G. xylinus</i> excretando as fibrilas da celulose bacteriana.....	25
Figura 06-	Representação esquemática da extrusão das nanofibrilas durante a produção da celulose bacteriana pelas bactérias <i>Gluconacetobacter xylinus</i>	26
Figura 07-	Microscopia eletrônica de varredura evidenciando a diferença da espessura das fibrilas da celulose bacteriana (a) e celulose vegetal (b).....	27
Figura 08-	Representação dos monômeros de glicose formando ligações de hidrogênio intramolecular e intermolecular existentes na celulose bacteriana.....	28
Figura 09-	Fotografia da celulose bacteriana sendo utilizada na fabricação da sobremesa nata de coco (a) e em curativos (b).....	30
Figura 10-	Mecanismo de hidrólise (a) e condensação (b) em meio ácido de alcóxissilanos.....	37
Figura 11-	Mecanismo de hidrólise (a) e condensação (b) em meio básico de alcóxissilanos.....	38
Figura 12-	Mapa com localização dos pontos de amostragem da bacia hidrográfica do rio Igarassu, Pernambuco, Brasil.....	53
Figura 13-	Fotografia da membrana de celulose bacteriana produzida na superfície do meio de cultura (13 a), Membrana de	58

	celulose purificada (13 b), Membrana de celulose bacteriana modificada com sílica (13 c)	
Figura 14-	Cromatogramas obtidos para quantificação de glicerol presente no meio de cultura durante a produção da CB pela <i>Gluconacetobacter xylinus</i>	59
Figura 15-	Espectroscopia na região do infravermelho da celulose bacteriana (a), celulose modificada após adição de tetraborato de sódio (b), e CB/sílica (CBSiB1)	61
Figura 16-	Proposta de reação para modificação da celulose bacteriana com sílica.....	62
Figura 17-	Curvas TG da CB, CBSiB1, CBSiB2 e CBSiB3.....	63
Figura 18-	Difratogramas da membrana de celulose e compósitos CBSiB1, CBSiB2 e CBSiB3.....	64
Figura 19-	Microscopia Eletrônica de Varredura CB (a), CBSiB1 (b), CBSiB2 (c) CBSiB3 (d).....	66
Figura 20-	Resultado das filtrações de suspensões concentradas de <i>E. coli</i> realizadas com membrana comercial e membrana de celulose modificada (CBSiB3) contendo a contagem de células a esquerda do gráfico e a absorbância a direita em função do número de filtrações realizadas	68
Figura 21-	Resultado das filtrações de suspensões concentradas de <i>E. coli</i> realizadas com membrana comercial e membrana de celulose bacteriana (CB) contendo a contagem de células a esquerda do gráfico e a absorbância a direita em função do número de filtrações realizadas.....	69
Figura 22-	Fotografia da BC/sílica (CBSiB3) (a) antes da filtração; (b) suspensão de <i>E. coli</i> antes e após a filtração; (c) Membrana após as dez filtrações.....	70
Figura 23-	Fotografias das placas de Petri inoculadas com amostras da bacia hidrográfica do rio Jaboatão antes e após a filtração com membrana de celulose bacteriana modificada (CBSiB3) e membrana comercial.....	71

Figura 24-	Fotografias das placas de Petri inoculadas com amostras da bacia hidrográfica do rio Igarassu antes e após a filtração com membrana de celulose bacteriana modificada (CBSiB3) e membrana comercial.....	74
Figura 25-	Espectro de infravermelho da celulose bacteriana e celulose bacteriana modificada com APTS, DPTS e TPTS	75
Figura 26-	Microscopia eletrônica de varredura da celulose bacteriana modificada com APTS (a) com DPTS (b) e TPTS (c)	77
Figura 27-	Fotografia e espectros de absorção obtidos para a membranas de celulose modificada com sililantes (a), celulose com NPAg (b), celulose modificada com sililante e nanopartículas de prata (c)	79
Figura 28-	Microscopia eletrônica de varredura CBAPTS-Ag (a), CBDPTS-Ag (b), CBTPTS- Ag (c), CB-Ag (d)	80
Figura 29-	Microscopia eletrônica de varredura dos compósitos CBAPTS-Ag (a), CBDPTS-Ag (b), CBTPTS-Ag (c) e CB-Ag (d) obtidas com detector de elétrons secundários (imagens localizadas a esquerda) e elétrons retroespalhados (imagens localizadas a direita)	81
Figura 30-	Histogramas das amostras CBAPTS-Ag, CBDPTS-Ag, CBTPTS-Ag e CB-Ag	83
Figura 31-	Teste de liberação das NPAg para a celulose bacteriana e compósitos: (a) CBAPTS-Ag, (b) CBDPTS-Ag, (c) CBTPTS-Ag e (d) CB-Ag	83
Figura 32-	Espectros de absorção eletrônica dos sobrenadantes após o teste de liberação da prata para a celulose bacteriana e os compósitos CB-Ag, CBAPTS-Ag, CBDPTS-Ag e CBTPTS-Ag	84
Figura 33-	Resultado do teste de disco-difusão para a CPAPTS, CBDPTS, CBTPTS e CB frente a <i>E. coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i> , <i>S. epidermides</i>	85
Figura 34-	Fotografias do resultado do teste de disco-difusão para a CPAPTS-Ag, CBDPTS-Ag e CBTPTS-Ag	87

Figura 35-	Espectro de infravermelho da membrana de celulose bacteriana (CB), celulose bacteriana modificada com sílica (CBSiB1, CBSiB2 e CBSiB3)	111
Figura 36-	Resultado das filtrações de suspensões concentradas de <i>E. coli</i> realizadas com membrana comercial e membrana de celulose modificada (CBSiB1)	111
Figura 37-	Resultado das filtrações de suspensões concentradas de <i>E. coli</i> realizadas com membrana comercial e membrana de celulose modificada (CBSiB2)	112
Figura 38-	Resultado das filtrações de suspensões concentradas de <i>E. coli</i> realizadas com membrana comercial e membrana de celulose modificada (CBSiB3)	112
Figura 39-	Gráfico com o resultado das filtrações de suspensões concentradas de <i>E. coli</i> realizadas com membrana comercial e membrana de celulose bacteriana (CB)	113
Figura 40-	Diagrama Unifilar contendo os pontos de amostragem da bacia hidrográfica de Jaboaão	114

LISTA DE QUADROS

Quadro 01-	Principais Processos de separação por membranas e suas separações.....	41
Quadro 02-	Lista dos reagentes e solventes utilizados na produção e modificação da celulose bacteriana com sílica.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 01-	Consumo de glicerol durante as produções de celulose bacteriana obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência....	58
Tabela 02-	Valores da taxa de produção e rendimento para as produções de CB.....	60
Tabela 03-	Comparação da estabilidade térmica e perda de massa da CB, CBSiB1, CBSiB2 e CBSiB3.....	64
Tabela 04-	Índice de Cristalinidade (IC%) da celulose bacteriana e celulose bacterina modificada (CBSiB1), (CBSiB2), (CBSiB3)	65
Tabela 05-	Quantificação de <i>E. coli</i> da bacia hidrográfica do rio Igarassu antes e após as filtrações com celulose bacteriana modificada e membrana comercial	73
Tabela 06-	Resultado das medidas dos halos de inibição para a celulose bacteriana modificada com sililantes e nanopartículas de prata..	86
Tabela 07-	Estações de amostragem da rede de monitoramento do rio Jordão	113

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CB	Celulose Bacteriana
CBAPTS	Celulose Bacteriana Modificada com 3-Aminopropiltrimetoxissilano
CBDPTS	Celulose Bacteriana Modificada com 3-2-aminoetilamino-propil-trimetoxissilano
CBTPTS	Celulose Bacteriana Modificada com N-3-trimetoxissililpropil-dietilenotriamina
CBSiB1	Celulose Bacteriana Modificada com Sílica
CBAPTS-Ag	Celulose Bacteriana Modificada com 3-Aminopropiltrimetoxissilano e nanopartículas de prata
CBDPTS-Ag	Celulose Bacteriana Modificada com 3-2-aminoetilamino-propil-trimetoxissilano e nanopartículas de prata
CBTPTS-Ag	Celulose Bacteriana Modificada com N-(3-trimetoxissililpropil) dietilenotriamina e nanopartículas de prata
CPRH	Agência Estadual do Meio Ambiente
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NPAg	Nanopartícula de prata
TEOS	Tetraetilortossilicato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	CELULOSE BACTERIANA	20
1.1.1	Biossíntese da celulose bacteriana	22
1.2	APLICAÇÕES DA CELULOSE BACTERIANA.....	29
1.2.1	Curativos de Celulose Bacteriana.....	31
1.3	SÍLICA.....	34
1.3.1	Preparação de sílica por hidrólise de alcóxidos.....	35
1.4	MEMBRANAS FILTRANTES.....	39
1.4.1	Processos de separação por membranas.....	40
1.5	FERIDAS CRÔNICAS E O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO	43
1.6	MECANISMO DE AÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	45
2	OBJETIVOS.....	48
2.1	OBJETIVO GERAL.....	48
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
3	PARTE EXPERIMENTAL	49
3.1	MATERIAIS UTILIZADOS: SOLVENTES E REAGENTES	49
3.2	PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA.....	50
3.2.1	Rendimento das produções de celulose bacteriana	50
3.3	MODIFICAÇÃO DA MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA COM SÍLICA.....	51
3.10	CARACTERIZAÇÕES.....	55
3.10.1	Análise térmica.....	56
3.10.2	Difratometria de raios X.....	56

3.10.3	Espectroscopia de infravermelho	56
3.10.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	56
3.10.5	Espectroscopia de Absorção Eletrônica (UV-Vis)	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.7	TESTE DE LIBERAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	83
5	CONCLUSÕES	89
6	PERSPECTIVAS	91
	REFERÊNCIAS.....	92
	APÊNDICE A- ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA CBSiB1, CBSiB2 E CBSiB3.....	111
	APÊNDICE B- CONJUNTO DE FILTRAÇÕES DA CELULOSE BACTERIANA MODIFICADA (CBSiB1, CBSiB2 E CBSiB3).....	112
	APÊNDICE C- CONJUNTO DE FILTRAÇÕES DA CELULOSE BACTERIANA	114
	ANEXO A- LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA REDE DE MONITORAMENTO DO RIO JABOATÃO.....	115
	ANEXO B- DIAGRAMA UNIFILAR CONTENDO OS PONTOS DE COLETA DO RIO JABOATÃO E DESCRIÇÃO DAS ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM	116

1 INTRODUÇÃO

A celulose, um polímero largamente encontrado na natureza, é produzida por vegetais e uma série de micro-organismos. Ela é constituída por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 cuja unidade estrutural de repetição é a celobiose. De grande importância na economia global, a celulose é utilizada em diversos segmentos industriais tornando-se um material de grande interesse na sociedade (CACICEDO *et al.*, 2016; VITTA; THIRUVENGADAM, 2012).

A celulose bacteriana (CB) é formada diretamente como resultado do metabolismo da *Gluconacetobacter xylinus* (SHAH *et al.*, 2013). É considerada a melhor produtora de celulose dentre os micro-organismos, apresentando-se como alternativa sustentável para a produção de novos materiais. A CB possui a mesma estrutura química da celulose vegetal, porém, livre de lignina, pectina e hemicelulose presentes na parede celular das plantas.

Por possuir grande quantidade de hidroxilas, a celulose pode ser modificada com o intuito de adicionar novas propriedades ao polímero, aliando as suas características intrínsecas às funcionalidades inseridas após a modificação, expandindo assim o seu potencial de aplicação (STUMPF *et al.*, 2018). A produção de compósitos de celulose bacteriana tem sido ferramenta de estudo em todo o mundo, impulsionando a fabricação de novos materiais com potenciais biotecnológicos de alto nível que podem ser utilizados na indústria alimentícia (SHI *et al.*, 2014), na produção de materiais super hidrofóbico para absorção de óleos (HE *et al.*, 2018) e na área da saúde (SULAEVA *et al.*, 2015).

As propriedades intrínsecas da CB, em especial, a alta porosidade ocasionada pelo arranjo tridimensional de nanofibrilas favorece a sua utilização na constituição de membranas para filtração do ar (LIU *et al.*, 2017) e do fitoplâncton *Chlorella sp.*, (WANICHAPICHART *et al.*, 2002), apresentando possibilidades para sua utilização na remoção de contaminantes comumente encontrados em efluentes (micro-organismos, metais, corantes, óleos, matéria orgânica etc.).

As membrana de celulose bacteriana tem maior relevância no campo da biomedicina como revisado por Fu *et al.* (2013), Petersen e Gatenholm (2011), Torgbo e Sukyal (2018), Wang *et al.* (2018). Na área da saúde a CB tem sido estudada como curativos, vasos sanguíneos artificiais, na engenharia de tecidos atuando como *template* para regeneração tecidual, dura-máter artificial e em sistemas de *drug*

delivery (CZAJA, *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2013; ALMEIDA *et al.*, 2014; KWAK *et al.*, 2015).

Curativos à base de celulose bacteriana tem sido cada vez mais difundidos por ser hipoalergênico, biocompatível, possuir alta capacidade de adsorção do exsudato (líquido que extravasa dos vasos e paredes celulares, que é eliminado após a lesão da pele, como uma reação natural do organismo no processo de cicatrização), boa aderência a pele mesmo em regiões com grande rugosidade, alta estabilidade mecânica, adequada troca de gases permitindo a respiração epitelial facilitando o processo de cicatrização do ferimento em tempo menor do que quando curativos convencionais são utilizados (TAZIMA; ANDRADE; MORIYA, 2008; SULAEVA *et al.*, 2015).

As membranas de celulose, apesar de possuir todas as propriedades citadas anteriormente, não possuem ação bactericida. Neste sentido, muitos estudos estão sendo realizados, no intuito de introduzir agentes capazes de inibir a proliferação de micro-organismos patogênicos em ferimentos diminuindo, conseqüentemente, os riscos de infecções (FUN; ZHANG; YANG, 2013). As nanopartículas de prata são excelentes candidatas nesse sentido, por apresentarem atividade antimicrobiana para um amplo espectro de micro-organismos, incluindo cepas resistentes a antibióticos (YANG *et al.*, 2012).

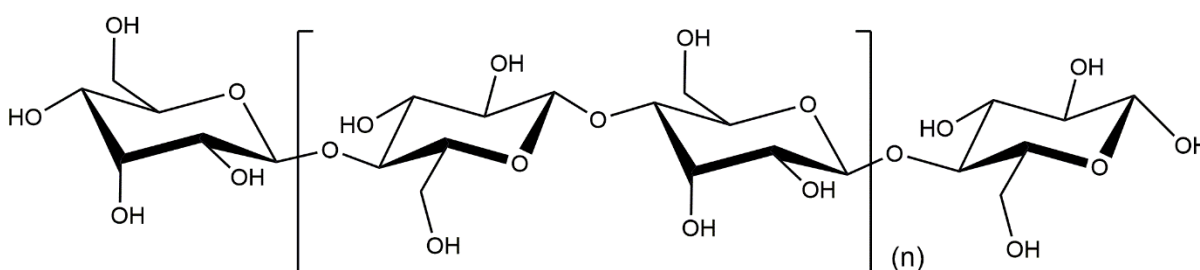
A produção de celulose bacteriana, nessa tese, é o resultado de um processo de fermentação que possui como principal fonte de carbono o glicerol, subproduto da produção do biodiesel, apresentando-se como uma alternativa sustentável e mais viável economicamente. Após a purificação da celulose, as membranas foram modificadas com sílica para a produção de uma membrana filtrante e com 3-aminopropil-trimetoxissilano (APTS), 3-(2-aminoetilamino)-propil-trimetoxissilano (DPTS) e N-(3-trimetoxissililpropil)-dietilenotriamina (TPTS) aos quais foram adicionados nanopartículas de prata (NPAg) para produção de um curativo com propriedades antimicrobianas.

1.1 CELULOSE BACTERIANA

A celulose foi descrita pela primeira vez por Anselme Payen em 1838, considerada um polímero de grande abundância na terra, com uma produção anual por fotossíntese em torno de 10^{12} toneladas (KLEMM *et al.*, 2005; DUFRESNE, 2017; WUSTENBERG, 2015). De grande importância na economia global, a celulose possui propriedades únicas em função da sua estrutura tridimensional, tornando-se um material de grande interesse tecnológico, com aplicações na produção de papel, materiais utilizados na medicina, na composição de alimentos dietéticos, produtos farmacêuticos e cosméticos (CACICEDO *et al.*, 2016; VITTA; THIRUVENGADAM, 2012).

A celulose é um homopolissacarídeo linear composto quimicamente por cadeias de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 dispostas em 180° uma em relação a outra (WERTZ *et al.*, 2010). A Figura 01 mostra a estrutura química da celulose.

Figura 01- Estrutura química da celulose.



Fonte: Vitta; Thiruvengadam (2012)

Esse polissacarídeo compõe a parede celular das plantas, mas também pode ser produzido por bactérias, fungos e tunicatos (animais marinhos produtores de celulose). Dentre os micro-organismos produtores de celulose a bactéria *Gluconacetobacter xylinus* é a de maior importância. Uma única célula é capaz polimerizar até 200.000 moléculas de glicose por segundo (HESTRIN; SCHRAMM, 1954). Além da *Gluconacetobacter xylinus*, vários gêneros de micro-organismos são capazes de excretar a celulose tais como: *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*,

Achromobacter, *Azobacter*, *Salmonella*, *Escherichia* e *Sarcina* (SHEYKHNAZARI et al., 2011; SULAEVA et al., 2015).

A celulose de origem vegetal possui a mesma estrutura química da celulose de origem bacteriana, porém a CB (celulose bacteriana) é constituída por uma estrutura tridimensional formada por nanofibrilas. A CB possui cristalinidade superior à da celulose vegetal, alta capacidade de absorção de água, cerca de 100 vezes mais do que seu próprio peso, excelentes propriedades mecânicas (módulo de Young de 15-35 GPa e resistência a tração de 200-300 MPa) além de ser atóxica, hipoalergênica, biocompatível, totalmente livre de lignina, pectina e hemicelulose que são encontradas na composição da celulose vegetal (BARUD et al., 2016; CZAJA, et al., 2006; HU et al., 2014; JONAS; FARAH, 1998; KLEMM et al., 2005; VITTA; THIRUVENGADAM, 2012; SHI et al., 2014).

O primeiro cientista a reportar a produção de celulose por *Acetobacter xylinus* (bactéria denominada atualmente como *Gluconacetobacter xylinus*), foi Brown em 1886, que observou o crescimento de uma película branca e gelatinosa (celulose) na superfície do meio de cultura durante a produção de vinagre (BROWN, 1886; YAMANADA; HOSHINO; ISHIKAWA, 1997).

A película de celulose formada na superfície do meio de cultura, durante o cultivo, funciona como uma proteção contra a radiação ultravioleta, permitindo também, a retenção de umidade e fixação das bactérias na interface ar-líquido possibilitando a obtenção de oxigênio essencial para o seu crescimento (SETYAWATI; CHIEN; LEE, 2009). A Figura 02 mostra *G. xylinus* durante a produção da membrana de celulose.

Figura 02- Imagem de microscopia eletrônica de varredura da *Gluconacetobacter xylinus* durante a produção da celulose bacteriana.



Fonte: Shi et al. (2014)

A *Gluconacetobacter xylinus* (*G. xylinus*) é uma bactéria bacilar, não patogênica, gram-negativa, aeróbica estrita que produz celulose quando incubada em pH 3-7 e entre 15 a 34 °C. As cepas da bactéria são resistentes ao calor, sendo registrado a temperatura de morte térmica entre 65°C e 70°C. A *G. xylinus* é encontrada principalmente em frutas e sucos em decomposição além da superfície de flores, frutas e plantas sendo utilizada na produção de celulose bacteriana em escala industrial (BILGI *et al.*, 2016).

Os pesquisadores têm buscando meios de cultura cada vez mais baratos e com altos rendimentos para a produção de celulose bacteriana. Nesse sentido, diversas fontes de carbono como glicose, manitol, frutose, sacarose, galactose, lactose, maltose, xilose, além de subprodutos da agricultura e resíduos industriais de óleo de milho, melaço, pele de uva, sucos de frutas e glicerol, são reportados como fonte de carbono para as bactérias (ÇAKAR *et al.*, 2014; CARREIRA *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2013; KESHK; SAMESHIMA, 2005; KUROSUMI *et al.*, 2009; MASAOKA; OHE; SAKOTA, 1993; RUKA; SIMON; DEAN, 2012). A produção da CB utilizando glicerol, como fonte de carbono, tem ganhado cada vez mais destaque entre os pesquisadores por possuir baixo custo e proporcionar bons rendimentos de produção (KESHK; SAMESHIMA, 2005; MASAOKA; OHE; SAKOTA, 1993).

A CB pode ser produzida em cultivo estático ou sob agitação. Em cultivo estático há formação de uma película uniforme que pode ser utilizada na produção de curativos pela possibilidade de se adequar perfeitamente as irregularidades da pele causadas pelos ferimentos (ÇAKAR *et al.*, 2014). A produção dinâmica, com agitação em mesas agitadoras ou biorreatores, produz *pellets* de celulose com tamanhos e formas variadas e é amplamente utilizado na indústria alimentícia como estabilizantes de alimentos (SHI *et al.*, 2014). Outra variável que pode ser modificada, durante o processo de produção, é a espessura do produto determinada pelo tempo de incubação. Quanto maior for o tempo mais espessas serão as membranas.

1.1.1 Biossíntese da celulose bacteriana

A biossíntese de celulose bacteriana a partir da *Gluconacetobacter xylinus* é complexa, envolvendo várias etapas e enzimas. A produção de celulose ocorre paralelamente ao crescimento celular da *G. xylinus* e consome cerca de 10% da energia gerada (MCNAMARA; MORGAN; ZIMMER, 2015). Durante a produção da

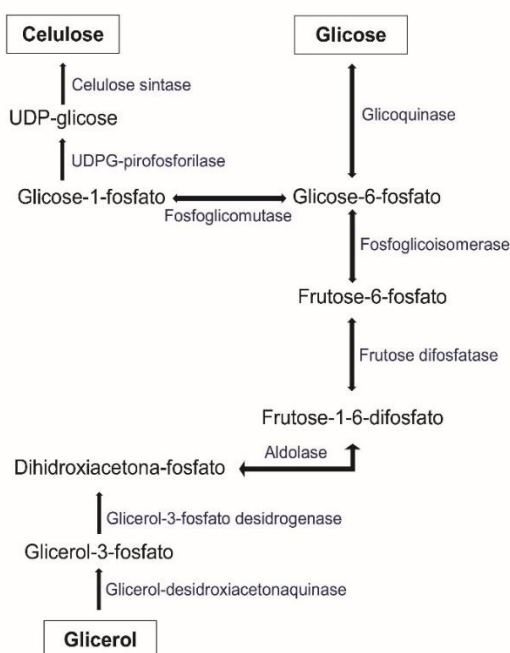
CB, primeiramente ocorre a polimerização dos resíduos de glicose, em seguida, há excreção extracelular das cadeias lineares do polímero e, por fim, a cristalização das cadeias de glicose de acordo com Ross; Mayer; Benziman, (1991); Brown, (1996). O processo de conversão da glicose à celulose ocorre resumidamente em quatro principais passos: (i) fosforilação da glicose pela enzima Glicoquinase com a participação de uma adenosina trifosfato (ATP); (ii) isomerização da glicose 6-fosfato para a glicose-1-fosfato pela ação da enzima fosfoglicomutase; (iii) síntese da uridina difosfato glicose (UDPG) pela enzima uridina difosfato pirofosforilase e (iv) produção de celulose pela ação da enzima celulose sintase (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; CANNON; ANDERSON, 1991).

A utilização do glicerol como fonte de carbono para a produção da CB leva a uma via metabólica distinta. Ross; Mayer; Benziman (1991) afirmam que a produção de celulose a partir do glicerol inicia com a conversão do glicerol em glicerol-3-fosfato pela ação da enzima desidroxiacetonaquinase com a participação de um ATP. O glicerol-3-fosfato forma o diidroxiacetona-fosfato a partir da ação da enzima glicerol-3-fosfato-desidrogenase. A diidroxiacetona-fosfato catalisada pela enzima triose fosfato isomerase forma o gliceraldeído-3-fosfato. Este, por sua vez forma a frutose-1,6-bifosfato catalisada por uma aldolase. A frutose-1,6-bifosfato sofre ação da enzima frutose difosfatase produzindo a frutose-6-fosfato que sofre ação da enzima fosfoglicoisomerase para formar a glicose-6-fosfato. As últimas etapas são as mesmas da biossíntese da CB utilizando glicose como fonte de carbono.

Durante a produção da celulose, a celulose sintase, considerada a enzima mais importante no processo, está firmemente ligada a membrana plasmática da bactéria responsável por catalisar a polimerização das unidades de UDPG (uridina difosfato glicose) em cadeias glicosídicas do tipo β -1,4, como também, viabiliza a movimentação do polímero formado através da membrana celular (CANNON; ANDERSON, 1991; KLEMM *et al.*, 2001).

A Celulose sintase é um complexo de proteína composto por três genes *bcsA* (*bacterial cellulose synthase A*), *bcsB* (*bacterial cellulose synthase B*) e *bcsC* (*bacterial cellulose synthase C*). O gene responsável pela catálise da celulose é o *bcsA* composto por uma longa cadeia de 723-880 resíduos de aminoácidos (CANNON; ANDERSON, 1991; KLEMM *et al.*, 2001). A Figura 03 ilustra a biossíntese da celulose bacteriana utilizando glicerol como fonte de carbono.

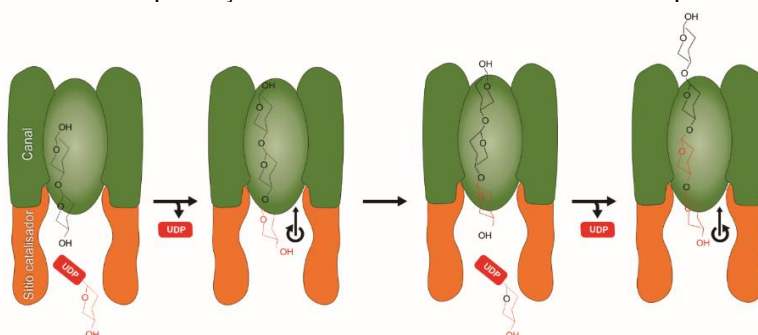
Figura 03- Biossíntese da celulose utilizando glicose e glicerol como substrato.



Fonte: Adaptado de Ross; Mayer; Benziman (1991)

A produção de celulose bacteriana ocorre a partir de uma reação SN2 onde o nucleófilo (grupo hidroxila localizado na posição 4 da glicose) ataca o carbono anomérico localizado na posição 1 da glicose presente na UDPG gerando UDP (uridina difosfato) como grupo de saída (LUSTRI, *et al.*, 2015). Cada unidade de glicose é adicionada individualmente provocando o alongamento do polímero no canal transmembrana de forma que a glicose recém adicionada ocupe o lugar do sítio aceitador e a UDP liberada é rapidamente substituída por outra unidade de UDPG, reiniciando o processo (MCNAMARA; MORGAN; ZIMMER, 2015; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991) como está ilustrado na Figura 04.

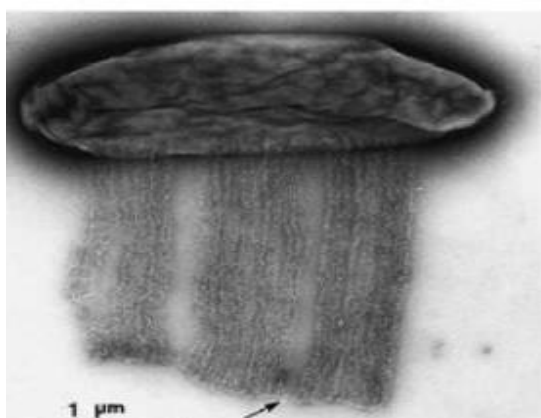
Figura 04- Mecanismo de produção da celulose bacteriana catalisada pela enzima celulose sintase.



Fonte: Adaptado de Lustri et al. (2015)

Durante a biossíntese da CB as cadeias de glicose são produzidas no interior das células de *G. xylinus* e excretadas na forma de fibrilas (cadeias poliméricas de glicose unidas longitudinalmente). As fibrilas são excretadas entre a membrana externa e a membrana citoplasmática por complexos terminais dispostos paralelamente em associação com poros da superfície da bactéria com diâmetro de 3,5 nm que contém celulose sintase no seu interior (JONAS; FARAH, 1998; KLEMM *et al.*, 2005). As cadeias são polimerizadas muito próximas umas das outras possibilitando a formação de uma estrutura altamente organizada com ligações de hidrogênio entre as moléculas de glicose, formando domínios cristalinos (BROWN, 1996; KLEMM *et al.*, 2005). A Figura 05 mostra a microscopia eletrônica de transmissão da bactéria *G. xylinus*, realizada por Hirai; Tsuji; Horii (2002) durante a excreção das fibrilas da celulose bacteriana.

Figura 05- Microscopia eletrônica de transmissão da *G. xylinus* excretando as fibrilas da celulose bacteriana.



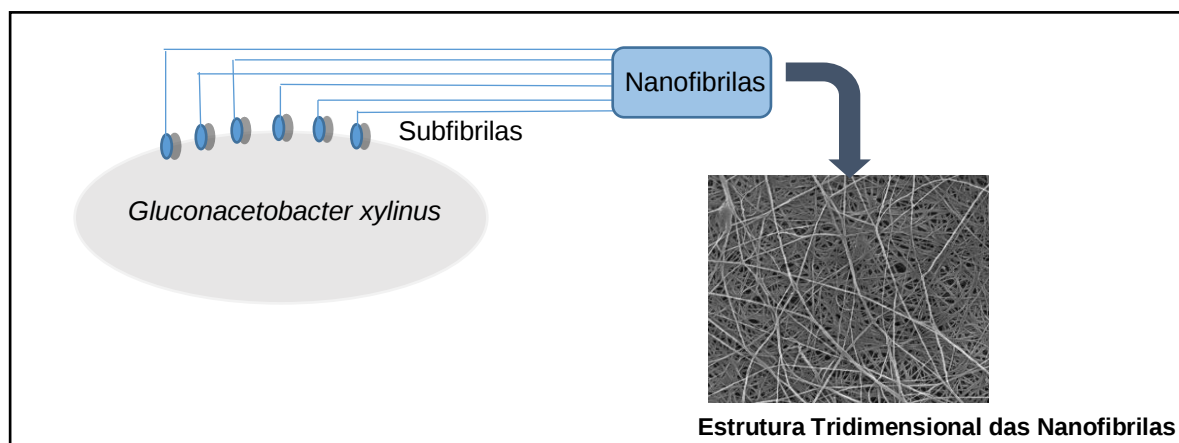
Fonte: Hirai; Tsuji; Horii (2002)

De acordo com Brown (1996) os complexos terminais presentes na *Gluconacetobacter xylinus* são organizados paralelamente, agrupados e próximos suficientes para que haja interação entre as cadeias de glicose de forma adjacente durante a extrusão das subfibrilas. Há entre 50 a 80 sítios de extrusão localizados na superfície da membrana plasmática da bactéria dispostos de forma regular ao longo do eixo axial.

Inicialmente, as cadeias com cerca de 8-15 unidades de glicose (denominadas de subfibrilas ou protofibrilas) são excretadas pelas bactérias e interagem com as subfibrilas vizinhas formando estruturas de maior espessura que se unem formando as nanofibrilas, também denominadas por alguns autores por microfibrilas (ROSS;

MAYER; BENZIMAN, 1991; IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000; KLEMM *et al.*, 2001). A Figura 06 representa excreção e formação das nanofibrilas pela parede celular das bactérias durante a produção da celulose bacteriana.

Figura 06- Representação esquemática da extrusão das nanofibrilas durante a produção da celulose bacteriana pelas bactérias *Gluconacetobacter xylinus*.



Fonte: Adaptado de Jonas; Farah, (1998)

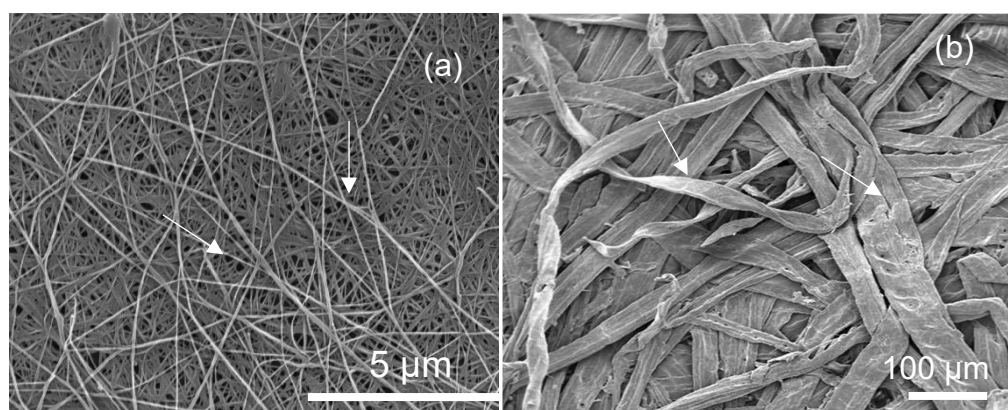
As nanofibrilas possuem cerca de 1000 cadeias de glicose individuais, e se arranjam tridimensionalmente construindo as membranas de celulose que são observadas macroscopicamente. As fibrilas da celulose bacteriana são em média 100 vezes menores do que as da celulose de origem vegetal com diâmetro que pode variar de 50 a 100 nm de acordo com He *et al.* (2018). O módulo de Young da CB está entre 15-35 GPa muito maior do que o encontrado para celulose vegetal que varia entre 5,5- 12,6 GPa (SULAEVA *et al.*, 2015; CACICEDO *et al.*, 2016; PECORARO *et al.*, 2008). A Figura 07 mostra a diferença das fibrilas da celulose vegetal (a) e da celulose bacteriana (b) a partir de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

As regiões cristalinas influenciam fortemente as propriedades mecânicas da celulose bacteriana. A rigidez do material é proporcionada pelos domínios cristalinos, constituídos por cadeias de glicose que se repetem de forma ordenada e são estabilizadas por ligações de hidrogênio intermolecular e intramolecular (ÇAKAR *et al.*, 2014; NPAVICHAYANUN *et al.*, 2015; WANG; ZHU; DU, 2011).

As ligações de hidrogênio e a orientação das moléculas de glicose podem sofrer variações originando alomorfos (compostos que possuem a mesma composição química, mas estruturas cristalinas diferentes). De acordo com Wertz *et al.* (2010), Gautam *et al.* (2010) e Habibi *et al.* (2010), a celulose possui 4 alomorfos denominados de celulose I, II, III e IV. A celulose III é obtida após o tratamento da

celulose I ou II com amônia líquida, e a celulose IV é produzida a partir do aquecimento da celulose III em glicerol a 260 °C. Os alomorfos I e II são os mais importantes do ponto de vista tecnológico, conseqüentemente mais estudados entre os pesquisadores.

Figura 07- Microscopia eletrônica de varredura evidenciando a diferença da espessura das fibrilas da celulose bacteriana (a) e celulose vegetal (b).



Fonte: Adaptado de Moon et al., (2011)

A celulose I é o alomorfo mais comum formada por dois subalomorfos, a celulose I α e a I β que foram descobertos por Atalla e Vanderhart em 1984. Esses subalomorfos coexistem na celulose I, em diferentes proporções dependendo da espécie e da fonte que a originou (BROWN, 1996). De acordo com Mohite e Patil, (2014) a celulose I α é comum em algas e bactérias e a celulose I β é predominante das paredes celulares de plantas e em tunicatos. As estruturas I α e I β possuem cadeias de glicose unidas em configuração paralela, diferenciando-se quanto aos padrões de ligação de hidrogênio originando uma cela unitária triclinica para a celulose I α e cela unitária monoclinica para a celulose I β (BROWN, 1999).

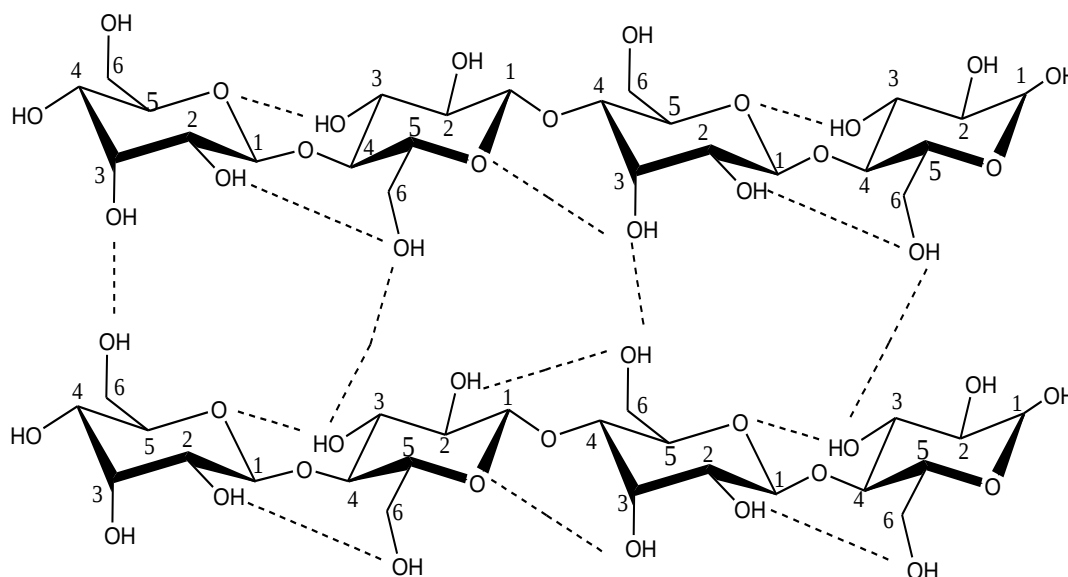
A celulose II é constituída por cadeias de glicose antiparalelas com extensas ligações de hidrogênio intermoleculares formando uma estrutura monoclinica. O alomorfo denominado celulose II é obtido após a merceração, processo industrial irreversível que submete a celulose I em meio básico e em altas temperaturas. Esse processo modifica a disposição dos monômeros arranjando as moléculas numa posição antiparalela, enquanto que os monômeros da celulose I são arranjados paralelamente. O termo paralelo é utilizado quando as cadeias estão na mesma direção, enquanto antiparalelo quando o sentido das ligações glicosídicas é alternado.

Algumas algas marinhas denominadas de *Halicystis* e bactérias gram positivas denominadas de *Sarcina* sintetizam naturalmente a celulose II (BROWN, 1999; KLEMM *et al.*, 2005).

As ligações de hidrogênio na celulose I são formadas em diferentes caminhos. A ligação intramolecular pode ser observada entre as hidroxilas localizadas na posição 3 e o oxigênio da posição 5 e entre a hidroxila localizada na posição 6 e hidroxila 2. Já as ligações de hidrogênio intermoleculares são formadas pela hidroxila da posição 3 e 6 como mostra a Figura 08.

As ligações de hidrogênio intramoleculares influenciam na rigidez da celulose uma vez que essas ligações estabilizam a orientação co-planar dos monômeros (GAUTAM *et al.*, 2010). Da análise da figura 8, percebe-se que as hidroxilas localizadas na posição 6 são mais reativas e mais susceptíveis a reações químicas reagindo cerca de 10 vezes mais rápido do que as demais de acordo com Lin e Dufresne (2014).

Figura 08- Representação dos monômeros de glicose formando ligações de hidrogênio intramolecular e intermolecular existentes na celulose bacteriana tipo I.



Fonte: Adaptado de Esa; Tasirin; Rahman (2014)

A celulose II possui ligação de hidrogênio intramolecular entre as hidroxilas localizadas na posição 3 e oxigênio da posição 5 e ligações de hidrogênio intermolecular entre a hidroxila da posição 6 e o oxigênio 2 e 3. Há ainda uma ligação intermolecular extra formada entre a hidroxila da posição 2 e oxigênio também da posição 2, ausente na celulose I (GAUTAM *et al.*, 2010).

1.2 APLICAÇÕES DA CELULOSE BACTERIANA

A CB é utilizada em diversos segmentos tais como, em engenharia de tecidos e no desenvolvimento de novos curativos (CZAJA *et al.*, 2006; KWAK *et al.*, 2015; LIN; DUFRESNE, 2014) na fabricação de vasos sanguíneos artificiais (KLEMM *et al.*, 2001), na indústria alimentícia, principalmente na constituição de sobremesas, como espessantes de alimentos e composição de embalagens (BUDHIONO *et al.*, 1999; CHAWLA *et al.*, 2009; WERTZ *et al.*, 2010), como membranas filtrantes do ar (LIU *et al.*, 2017), em sistemas de *drug delivery* (ALMEIDA *et al.*, 2014) na fabricação de OLEDs (UMMARTYOTIN *et al.*, 2012), desenvolvimento de display eletrônico (SHAH; BROWN, 2005) na constituição da dura-máter (uma das meninges que envolve o cérebro) e medula espinhal (MELLO *et al.*, 1997).

Na indústria de alimentos a aplicação mais comum é a utilização na fabricação da sobremesa denominada “nata de coco”, que recebe esse nome por conta da aparência das membranas com a polpa do coco. Essa sobremesa é oriunda das Filipinas e bastante difundida no sul da Ásia, rica em fibras, famosa por possuir um sabor suave podendo adquirir diversas cores, dependendo dos sabores artificiais adicionados (CHAWLA *et al.*, 2009). Além disso, a celulose bacteriana pode ser utilizada como estabilizante em sorvetes, em almôndegas chinesas conhecidas como *kung-wang* (KLEMM *et al.*, 2006), na indústria de cosméticos, compondo máscaras faciais, conhecidas comercialmente como Nanomasque®. Esses produtos são constituídos por celulose bacteriana impregnadas com substâncias que promovem hidratação e tratamento da pele como extrato de plantas, algas, óleos essenciais e pantenol, conferindo uma ação terapêutica às formulações (KLEMM *et al.*, 2006). A Figura 09 mostra a utilização da celulose bacteriana em duas aplicações distintas, na fabricação de nata de coco e na forma de curativos em pacientes com queimaduras para o tratamento de feridas.

Com o intuito de explorar todas as propriedades da celulose, expandindo seu potencial de aplicação, dois processos de modificação são realizados: a modificação *in situ* e a modificação *ex situ*. A reação química para a inclusão da modificação acontece com os grupos hidroxilas, presentes na membrana originando materiais de grande importância tecnológica (SHAH *et al.*, 2013; STUMPF *et al.*, 2018).

Figura 09- Fotografia da celulose bacteriana sendo utilizada na fabricação da sobremesa nata de coco (a) e em curativos (b).



Fonte: Shi et al. (2013) e Czaja et al. (2006)

A inserção de reagentes *in situ* induz a modificação da CB durante a biossíntese da membrana, ou seja, os reagentes químicos que se deseja incluir na celulose são adicionados ao meio de cultura e o processo de modificação ocorre concomitantemente à produção. A inserção de aditivos durante a biossíntese da celulose pode afetar a agregação das fibrilas, levando a modificações na cristalinidade e nas propriedades físicas do polímero (HU et al., 2014).

Park et al. (2015) adicionaram nanotubos de carbono durante a biossíntese da CB produzindo uma membrana para aplicação na medicina regenerativa. De acordo com os pesquisadores, o nanomaterial foi eficiente na regeneração óssea de ratos, apresentando uma nova perspectiva na medicina.

Nanopartículas de hidroxiapatita foram adicionadas durante o cultivo de *Gluconacetobacter xylinus*, obtendo-se celulose bacteriana modificada com alta capacidade de regeneração óssea. Saska et al. (2011) implantaram o material em ratos e não observaram nenhuma reação inflamatória, apresentando preenchimento dos defeitos ósseos dos animais após quatro semanas da implantação.

Butchosa et al. (2013) modificaram celulose bacteriana *in situ* com nanocristais de quitina, acrescentando para produção de um curativo com propriedades antimicrobianas. O material apresentou atividade antimicrobiana para *Escherichia coli*, inibindo seu crescimento.

A inserção de grupos químicos após a produção e purificação das membranas é chamada de modificação *ex situ*. Essa técnica é bastante difundida e foi utilizada nesse trabalho para modificação das membranas celulósicas.

Silva *et al.* (2014) modificaram celulose bacteriana *ex situ* com diclofenaco de sódio, no intuito de produzir um sistema de liberação trans dérmica da droga e diminuição dos efeitos colaterais ocasionados pela ingestão das cápsulas. O perfil de liberação indicou que cerca de 60% de diclofenaco de sódio foi liberado nos primeiros 5 minutos, apresentando um perfil de permeação cutânea *in vitro* bastante promissor. Os pesquisadores acreditam que o material apresenta grande potencialidade para um eficiente sistema de *drug delivery*.

Kim *et al.* (2011) e Lin *et al.* (2013) modificaram celulose bacteriana com quitosana, após a produção da celulose bacteriana, para aplicação em curativos com capacidade antimicrobiana. O material obtido apresentou atividade antimicrobiana para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* com proliferação uniforme das células de fibroblastos, favorecendo a cicatrização de feridas.

Barud *et al.* (2015) produziram celulose bacteriana modificada com fribroína de seda. O polímero não apresentou citotoxicidade nem genotoxicidade, além disso, promoveu a adesão e proliferação celular apresentando-se como uma excelente opção na bioengenharia, principalmente na regeneração de tecidos.

1.2.1 Curativos de Celulose Bacteriana

Tendo em vista a crescente necessidade de agilizar o processo de cicatrização de feridas, pesquisadores tem buscado curativos que facilitem a re-epitelização da pele, favorecendo a reestruturação dos tecidos lesionados, bem como agentes que combatam infecções, que é o principal causador de mortes em pacientes hospitalizados por queimaduras graves e feridas crônicas. Nesse sentido, a CB tem despertado interesse em aplicações na medicina, principalmente na confecção de curativos (LIN *et al.*, 2013; 2014; KWAK *et al.*, 2015).

A escolha adequada dos curativos, utilizados durante o tratamento de feridas crônicas e queimaduras de grande intensidade, deve promover uma rápida reestruturação da pele e facilitar o processo de cicatrização (CZAJA *et al.*, 2006). De acordo com Sulaeva *et al.* (2013), a utilização de celulose bacteriana como curativo facilita o processo de re-epitelização da pele e acelera a cicatrização das feridas em espaço de tempo muito menor do que quando os curativos convencionais são utilizados.

Os curativos tradicionais são feitos com gazes, frequentemente utilizadas em hospitais para o recobrimento de ferimentos. Esses curativos são utilizados desde a década de 70 e tem como principal desvantagem a sua remoção após o tratamento, já que eles se aderem a pele causando sangramento e danos a pele recém-formada. Além disso, a gaze dificulta a respiração da pele e ainda provoca o seu ressecamento ocasionado pela alta absorção do exsudato levando a contaminação da lesão com crescimento bacteriano acelerado (KAMOUN; KENAWY; CHEN, 2017).

Dentre os benefícios de se utilizar a celulose bacteriana como curativo destaca-se a maior respiração da pele e permeabilidade a gases, boa estabilidade mecânica, fácil aplicação e remoção evitando a retirada de pele durante a troca de curativos, alta permeação de vapor de água, ser aderido facilmente em diversos tipos de ferimentos e regiões irregulares do corpo, ser biocompatível e hipoalergênico (WANG; ZHU; DU, 2011; SULAEVA *et al.*, 2015). Além disso, a aplicação da CB no recobrimento das feridas ou áreas queimadas provoca um alívio imediato na dor, com efeito hemostático (vedando a área lesionada e impedindo o sangramento excessivo), e ainda a utilização da CB não requer trocas diárias gerando um grande benefício para os pacientes com queimaduras graves, protegendo o tecido em construção sem danificá-lo (CABRAL, *et al.*, 2006; CZAJA, *et al.*, 2006).

A primeira empresa a utilizar curativos de celulose bacteriana para tratar ferimentos foi a Johnson & Johnson em 1987. No Brasil, a Biofill Produtos Biotecnológicos presente em Curitiba comercializa produtos para tratamento de queimaduras e feridas crônicas servindo como pele artificial temporária (CZAJA *et al.*, 2006). Outras empresas, no mundo inteiro, comercializam produtos para fins médicos compostos por celulose bacteriana, como por exemplo, a Gengiflex® que possui artigos para o tratamento de doenças periodontais, a XCell® que comercializa curativos para tratamento de feridas crônicas, a BASYC® que possui celulose bacteriana tubular para microcirurgia de artérias e a Cellumed® empresa destinada a produção de materiais para fins veterinários (BARUD *et al.*, 2010).

Apesar dessas excelentes características a celulose bacteriana não possui atividade antimicrobiana intrínseca. Nesse sentido, a utilização das membranas não combate a colonização de micro-organismos patógenos comuns em ambiente hospitalar que ocasionam infecções graves e podem levar o paciente a morte (MANEERUNG *et al.*, 2008).

A adição de agentes antimicrobianos alia todos os benefícios típicos das membranas de celulose à diminuição da probabilidade do paciente contrair infecções. Curativos de celulose bacteriana modificada com quitosana (Lin *et al.*, 2013) adicionaram uma ação antimicrobiana comprovada para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* ao material, apresentando-se como uma excelente alternativa no processo de cicatrização de feridas.

Wichai *et al.* (2019) produziram um compósito de celulose bacteriana/ alginato/ quitosana e sulfato de cobre (II) com atividade antimicrobiana para bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo bactérias resistentes a antibióticos. A citotoxicidade do material foi avaliada a partir de testes com fibroblastos de camundongos e humanos, demonstrando grande potencialidade de aplicação do material como curativos antimicrobianos.

No contexto de produção de curativos com propriedades antimicrobianas, ganha destaque a celulose bacteriana impregnada com nanopartículas de prata. Os compostos de prata são utilizados na medicina com fins terapêuticos, para o tratamento de feridas, conjuntivite e uma série de doenças infectocontagiosas (MOSER *et al.*, 2013). Moyer e Monafo foram os primeiros a introduzir a utilização de sais de prata no tratamento tópico de queimaduras em 1960. A utilização na forma de creme ou suspensão aquosa composta por nitrato de prata com sulfadiazina é utilizado desde o final da década de 60 até os dias de hoje, como o tratamento mais comum e eficaz nos hospitais que cuidam de pacientes com queimaduras (FONG; WOOD, 2006).

Pesquisadores do mundo inteiro estudam a capacidade antimicrobiana de materiais constituídos por celulose bacteriana e nanopartículas de prata (NPAg) durante o processo de cicatrização de feridas. A introdução da NPAg em uma matriz polimérica pode ser realizada *in situ* quando as nanopartículas são diretamente geradas no interior da matriz polimérica e *ex situ* quando as NPAg são primeiramente produzidas e depois inseridas na matriz polimérica (GUO *et al.*, 2014).

Barud *et al.* (2011) produziram membranas de celulose bacteriana com propriedades antimicrobianas a partir da introdução de nanopartículas de prata *in situ* utilizando o trietanolamina como agente redutor e complexante. O estudo das propriedades antimicrobianas foi realizado pelo teste de difusão de disco demonstrando atividade para *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Maneerung et al. (2008) inseriram nanopartículas de prata na celulose *in situ* a partir da imersão da membrana em solução de nitrato de prata e borohidreto de sódio. Os pesquisadores comprovaram a ação antimicrobiana para *E. coli* e *S. aureus* a partir do teste de difusão de disco.

Wu et al (2014) produziram nanopartículas de prata *in situ* utilizando o reagente de Tollens (solução amoniacal de nitrato de prata) com a celulose bacteriana atuando como *template* nano-reativo. De acordo com os pesquisadores houve formação de nanopartículas de prata esféricas que interagiram fortemente com as fibrilas apresentando ação antimicrobiana para *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosas*.

O fator limitante para a impregnação de nanopartículas de prata em celulose bacteriana é a fraca interação, meramente eletrostática, entre a prata e a CB podendo ocasionar uma liberação rápida e descontrolada das nanopartículas (WU et al., 2014). Muitos trabalhos na literatura reportam a adição de nanopartículas de prata à celulose bacteriana (MANEERUNG, et al., 2008; MARIA, et al., 2009; BARUD, et al., 2011) mas, nenhum deles até o momento, reportou o estudo de celulose bacteriana modificados com agentes sililantes aminados com o intuito de ancorar a prata e evitar sua lixiviação como está sendo proposto nessa tese.

1.3 SÍLICA

A denominação sílica refere-se aos compostos de óxido de silício (SiO_2) que podem ser encontrados na forma cristalina, como quartzo e cristobalita, ou amorfa como por exemplo, a opala mineral encontrada nas minas da Austrália e da América Central (BERGNA; ROBERTS, 2006). Na natureza, a sílica é encontrada ainda na areia, nas rochas, em plantas como no bambu, em alimentos como no arroz e na cevada. Na forma sintética, está presente em vidros, cerâmicas, concreto, na indústria de alimentos, em cosméticos, isolantes térmicos, dispositivos eletrônicos e computadores constituindo uma vasta classe de materiais de grande importância para a sociedade (VANSANT; VOORT; VRANCKEN, 1995; PRADO; FARIA; PADILHA, 2005; HYDE *et al.*, 2016; MEBERT *et al.*, 2017)

A identificação de grupos silanóis ocorreu em 1934 por Hofman abrindo caminho para a funcionalização da sílica e o desenvolvimento de uma nova classe de materiais. Consideráveis progressos no estudo da química da superfície da sílica foram realizados entre 1960 e 1970 (BERGNA; ROBERTS, 2006; ZHURAVLEV, 2000)

e atualmente esses grupos são vastamente explorados como sítios reativos permitindo a sua modificação química e possibilitando sua aplicação em diversos segmentos tais como: fase estacionária para cromatografia (HOU *et al.*, 2018; QU *et al.*, 2017), na remoção de metais para tratamento de água (BOIS *et al.*, 2003; QUINTANILLA; SÁNCHEZ; SIERRA, 2016; TAHERGORABI *et al.*, 2016) na adsorção de poluentes orgânicos (PHAN; BACQUET; MORCELLET, 2002; SHI *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2000) em suporte para catalisadores (GAC *et al.*, 2018), em materiais utilizados na área da saúde (KAYA; CRESSWELL; BOCCACCINI, 2018; REIS, 2007) e remoção de micro-organismos (ZEMNUKHOVA; KHARCHENKO; BELENEVA, 2015).

1.3.1 Preparação de sílica por hidrólise de alcóxidos

O processo sol-gel é uma rota sintética versátil utilizada para a produção de sílica, e foi relatado inicialmente por J. Elbemen em 1846. (BRINKER; SCHERER, 1990). Essa tecnologia foi utilizada industrialmente, quase um século depois em 1930, na produção de vidros pela empresa alemã *Schott Company*, ganhando maior repercussão no desenvolvimento de novos materiais apenas por volta de 1970 com a produção de uma grande variedade de alcóxidos metálicos (DIMITRIEV; IVANOVA; IORDANOVA, 2009; DONATTI, 2003).

Os precursores empregados para a obtenção de sílica podem ser sais inorgânicos ou alcóxidos, sendo o tetrametilortosilicato (TMOS) e o tetraetilortosilicato (TEOS) os mais utilizados (SINGH *et al.*, 2014). Além de alcóxidos de silício empregados para a produção de sílica, o processo sol-gel é utilizado para sínteses de diversos materiais constituídos comumente por alcóxidos de titânio, alumínio e zircônio (CAI *et al.*, 2015; CATAURO *et al.*, 2019; CRIŞAN *et al.*, 2011).

As vantagens dessa técnica têm despertado cada vez mais o interesse dos pesquisadores principalmente pela possibilidade da síntese de materiais em condições brandas e a obtenção de materiais híbridos orgânico-inorgânicos com adição, durante a produção da sílica, de agentes sililantes com funções químicas desejadas para aplicações específicas (AIROLDI; FARIAS, 2004). Esses materiais começaram a ganhar destaque a partir da década de 80 e são constituídos por componentes orgânicos e inorgânicos com propriedades sinérgicas com uma larga aplicabilidade devido à combinação das propriedades mecânicas e térmicas

provenientes da fase inorgânica associada a processabilidade e flexibilidade típica do componente orgânico (JOSÉ; PRADO, 2005).

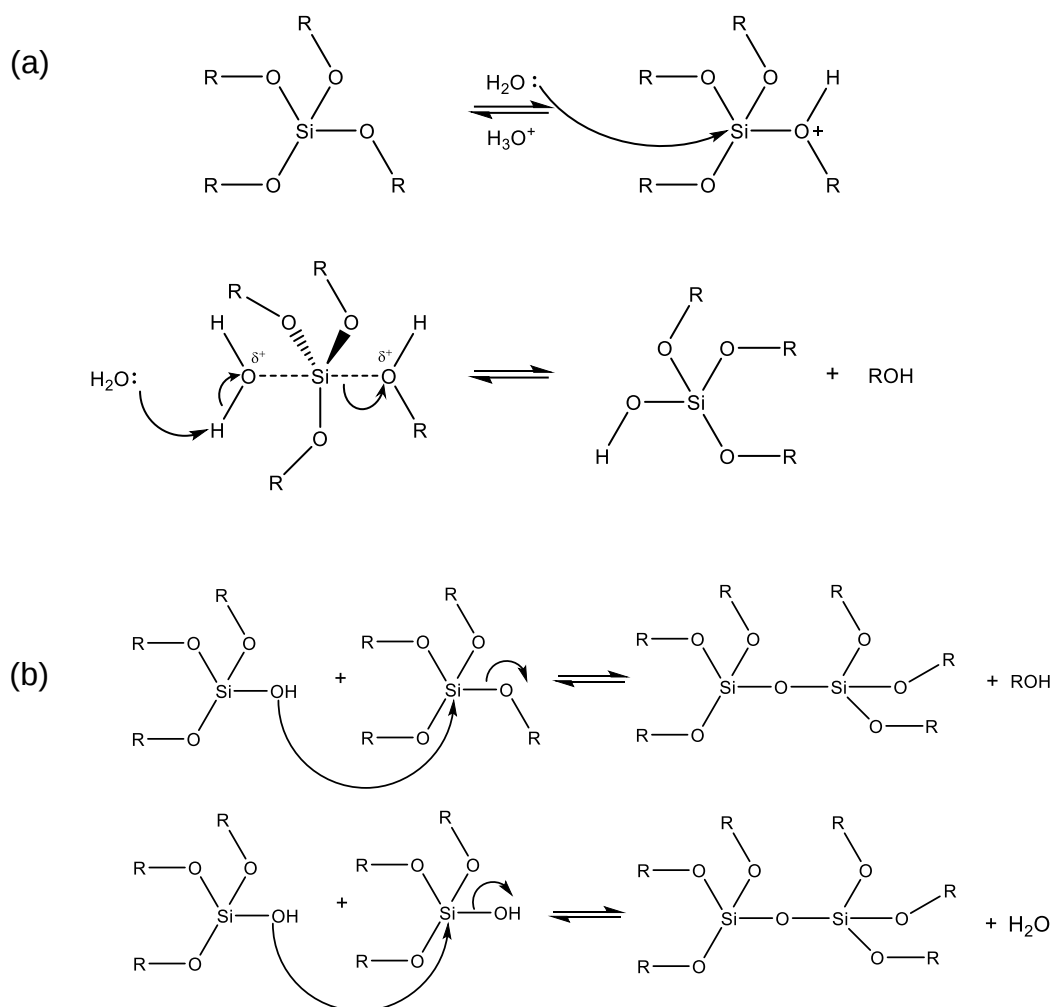
Para a produção de sílica, os parâmetros reacionais devem ser bem estabelecidos, pois influenciam diretamente nas propriedades do material obtido (CIRIMINNA *et al.*, 2013). Catalisadores ácidos ou básicos são utilizados para promover um aumento na velocidade das reações de hidrólise e condensação. De acordo com Alfaya e Kubota (2002), quando a sílica é produzida em meio ácido com baixo teor de água, o material final é mais denso e possui menor porosidade, enquanto preparações em condições básicas e altos teores de água, a sílica apresenta maior porosidade.

A reação de polimerização sol-gel é dividida em duas etapas básicas: a hidrólise e a condensação. Durante a hidrólise de um alcóxido de silício há formação de grupos silanóis reativos que sofrem reações de condensação, levando a formação de um gel constituído por ligações siloxanos. De acordo com Brinker e Sherer (1990), os mecanismos de hidrólise e condensação ocorrem simultaneamente, sendo o mecanismo de condensação bastante complexo, uma vez que as reações de condensação iniciam antes das reações de hidrólise terminarem. As Figuras 10 e 11 ilustram o mecanismo que ocorre durante a hidrólise ácida e básica respectivamente.

Quando as reações de hidrólise acontecem em meio ácido, o grupo alcóxido é protonado. A densidade eletrônica em torno do átomo de silício diminui tornando-o mais eletrofílico e mais propício ao ataque nucleofílico. A água ataca o silício via mecanismo SN2 e um álcool é eliminado formando os grupos silanol. Quando alcóxidos de cadeias grandes são utilizados, aumenta-se o efeito estérico ao redor do silício, diminuindo a taxa de hidrólise (BRINKER; SCHERER, 1990).

As reações de condensação ocorrem quando um silanol ataca o átomo de silício de um alcoxisilano ou outro grupo silanol a partir de uma reação SN2 formando uma ligação do tipo siloxano de acordo com as reações abaixo.

Figura 10- Mecanismo de hidrólise (a) e condensação (b) em meio ácido de alcoxissilanos.

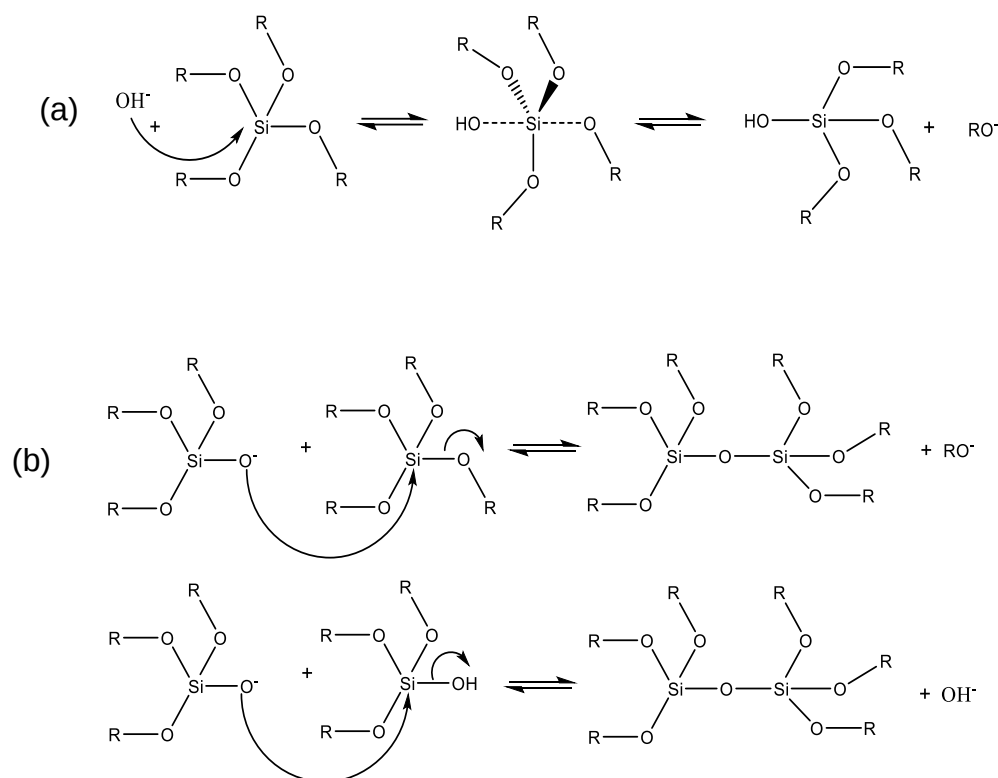


Fonte: Adaptado de Brinker e Scherer (1990)

Na hidrólise catalisada por base, o ânion hidróxido atua como nucleófilo atacando o átomo de silício também por uma reação do tipo S_N2 , originando um intermediário de ração pentacoordenado carregado negativamente. Um grupo OR é então eliminado por ser um melhor grupo de saída, originando o produto da hidrólise (BRINKER; SCHERER, 1990).

Durante a condensação em meio básico um grupo silanol desprotonado ataca um átomo de silício via reação S_N2 formando ligações siloxano.

Figura 11- Mecanismo de hidrólise (a) e condensação (b) em meio básico de alcóxissilanos.



Fonte: Adaptado de Brinker e Scherer, (1990).

Rotas sintéticas que utilizam a hidrólise de alcóxissilanos, como alternativa para a produção de compósitos de celulose bacteriana com sílica, têm sido utilizadas pelos pesquisadores para produção de novos materiais, Barud *et al.* (2008), por exemplo, inseriram nanopartículas de sílica em celulose bacteriana com o intuito de estudar a microestrutura do compósito. Os pesquisadores obtiveram celulose bacteriana modificada com nanopartículas de sílica com diâmetro entre 20-30 nm ligadas às nanofibrilas do polímero.

Guzun *et al.* (2014) produziram compósito constituído por celulose e sílica a partir da produção de nanopartículas de sílica *in situ* pelo método de Stöber. Além da caracterização do material, os autores estudaram a influência dos parâmetros reacionais na modificação da celulose, como também a capacidade do material de inibir a formação de biofilme quando a sílica foi funcionalizada com ácido úsnico. Os pesquisadores obtiveram inibição do crescimento de biofilme produzido por

Staphylococcus aureus sendo o compósito apresentado como uma alternativa para aplicações biomédicas.

1.4 MEMBRANAS FILTRANTES

A contaminação da água é, ainda, uma questão crítica a ser resolvida nos países em desenvolvimento (PANDEY *et al.*, 2014). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018), 2 bilhões de pessoas consomem água contaminada com fezes causando cerca de 502.000 mortes por diarreia a cada ano em todo o mundo. Em 2015, 2,3 bilhões de pessoas ainda não tinham acesso a serviços essenciais de saneamento (OMS, 2018). Esse quadro é consequência da urbanização não planejada e do descarte inadequado de resíduos domésticos e industriais, levando à contaminação da água, especialmente em rios e lagos (SCHWARZENBACH *et al.*, 2006; FRANCO; GAETANO; GIANNI, 2018).

O tratamento convencional de águas residuais usadas para desinfecção, como ozonização, cloração e radiação UV, exige alto investimento, equipamentos sofisticados e mão-de-obra qualificada com o uso de grandes quantidades de reagentes químicos prejudiciais ao meio ambiente (Caslake *et al.*, 2004). A filtração por membranas, por outro lado, é um dos métodos mais empregados na purificação de água e tratamento de efluentes (COLLIVIGNARELLI *et al.*, 2018) devido ao baixo consumo de energia e boa eficiência na separação de componentes (ULBRICHT, 2006).

Membranas são barreiras semipermeáveis utilizadas para a separação entre duas fases originando isolamento seletivo entre os componentes. Elas podem ser constituídas por compostos orgânicos (acetato de celulose, poliamidas, polisulfonas e etc.) ou inorgânicos (cerâmicas, óxidos de alumínio, zircônio e silício) (BHAVE, 1991). As membranas orgânicas são mais utilizadas por possuir menor custo quando comparadas as membranas inorgânicas (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Morfologicamente as membranas podem ser divididas em duas grandes categorias: membranas porosas ou não porosas (densas). As membranas porosas como, o próprio nome sugere, são formadas por poros onde ocorre o transporte dos constituintes. As membranas densas não possuem poros em sua superfície e são constituídas por um denso filme onde o transporte dos constituintes ocorre por difusão (RAVANCHI; KAGHAZCHI; KARGARI, 2009).

As membranas são ainda classificadas em isotrópicas (simétricas) ou anisotrópicas (assimétricas). As isotrópicas são membranas que possuem as mesmas características morfológicas em toda a sua estrutura podendo ser porosas ou densas. As membranas anisotrópicas possuem diferentes morfologias ao longo da estrutura podendo apresentar um filme seletivo ultrafino na superfície apoiada em uma subestrutura muito mais espessa e porosa. As membranas podem ser constituídas pelo mesmo material ou materiais de diferentes composições, quando isso ocorre a membrana é classificada como anisotrópica composta (BAKER, 2004; HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

1.4.1 Processos de separação por membranas

O primeiro relato da utilização de membranas na separação de componentes foi reportado por Nollet, em 1748, a partir da utilização de um diafragma animal. A observação de um fluxo preferencial foi relatada, e, pela primeira vez, características de seletividade e permeabilidade de uma membrana foram observadas (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Atualmente os processos de separação por membranas são utilizados em diversos segmentos, destacando-se no tratamento de água como uma barreira para filtração de micro-organismos; em tratamentos de hemodiálise, removendo ureia e toxinas durante a filtração do sangue; no processo de produção industrial de vinhos e cervejas, retirando as partículas em suspensão e proporcionando a clarificação do produto (MADAENI, 1999).

Os processos de separação por membrana podem ter diferentes mecanismos de separação: exclusão por tamanho, por difusão e por diferença na carga elétrica. Os processos utilizados dependem das características da membrana e do tipo de soluto que se deseja separar (LEE; ELAM; DARLING, 2016). O Quadro 01 possui os processos de separação por membrana e suas aplicações.

Quadro 01- Principais processos de separação por membranas e suas aplicações. Fonte: Baker (2004).

Processos de Separação	Tamanho de Poro	Aplicações
Microfiltração	0,1 - 10 μ m	Esterilização bacteriana, Clarificação de vinhos e cerveja
Ultrafiltração	2 - 100nm	Concentração de Macromoléculas, recuperação de pigmentos/Óleos
Osmose reversa	0,5 - 2nm	Dessalinização de água, concentração de sucos de frutas, produção de água pura para indústria farmacêutica
Eletrodialise	Não se aplica	Purificação de água, concentração de soluções salinas

A microfiltração teve início entre 1920 a 1930, quando utilizada pelos alemães para o controle de qualidade da água durante a segunda guerra mundial. Em 1940 a fabricação das membranas começou a despertar interesse comercial (BAKER, 2004), mas, com baixa produtividade e divulgação. Alguns anos depois, em 1954, a tecnologia de fabricação das membranas para microfiltração foi repassada para a atual Millipore Corporation® sendo a primeira empresa a produzir o material em grande escala.

Em 1953, membranas de acetato de celulose foram reportadas, pela primeira vez, como um material de grande eficiência para a retenção salina em sistemas de osmose reversa (MATSUURA, 2017), despertando cada vez mais o interesse entre os pesquisadores para o desenvolvimento de novos materiais com maior capacidade filtrante e baixo custo. O acetato de celulose e o nitrato de celulose foram os primeiros materiais derivados da celulose vegetal produzidos em laboratório como agentes filtrantes (EDGAR *et al.*, 2001). Essas membranas possuem elevada resistência mecânica, biodegradabilidade, alta capacidade de filtração, alta porosidade além de ser um material de baixo custo.

Atualmente, uma série de polímeros como poliamidas, poliolefinas, blendas de acetato de celulose, nitrocelulose, polietileno tereftalato, fluoreto de polivinilideno, polietersulfona, poli(vinil álcool), poliacrilonitrila e carvão ativado (EDGAR *et al.*, 2001; ULBRICHT, 2006; ZAINI; AMANO; MACHIDA, 2010; PENDERGAST; HOEK, 2011; CARPENTER; LANNOY; WIESNER, 2015) tem sido extensivamente utilizados na fabricação de membranas para purificação de água.

Idealmente, os filtros devem eliminar os micro-organismos patogênicos, compostos orgânicos e íons de metais pesados de uma só vez (MOHMOOD *et al.*, 2013). Para retenção dos micro-organismos, o tamanho dos poros da membrana deve ser menor que o tamanho das bactérias que varia comumente de 0,3 a 3,0 μm (GERARDI, 2006). Tipicamente os tamanhos de poros da celulose bacteriana relatados por Yin *et al.*, (2012), Guo; Catchmark (2012) e Li *et al.*, (2015) variam de 0,24 a 0,42 μm . De acordo com Li *et al.*, (2015), uma única membrana pode possuir tamanhos de poros diferentes, mas com valores desejáveis para a retenção das bactérias detectadas em águas residuais, como *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* entre outras (BITTON, 2005).

Cheng *et al.* (2017) propuseram a produção de membranas para filtração da mistura óleo/água utilizando membranas de nylon com tamanho de poro de 0,22 μm com nanocristais de celulose provenientes de tunicatos (animais marinhos produtores de celulose). As membranas apresentaram excelente estabilidade mecânica, boa resistência a pH e eficiência para filtração de diversas formulações de nanoemulsão apresentando-se, de acordo com os autores, como um dispositivo de separação de água e óleo simples e de baixo custo.

A utilização de materiais híbridos orgânicos-inorgânicos na fabricação de membranas funcionalizadas foi reportada por Taha *et al.*, (2012). Suportes químicos baseados em sílica são utilizados para separação específica de componentes, uma vez que há a possibilidade de modificação química e incorporação de diferentes funcionalidades no material. Nesse sentido, membranas de acetato de celulose, funcionalizadas com sílica/ NH_2 , foram produzidas para aplicação em tratamento de águas residuais. As membranas apresentaram alta porosidade e foram reportadas como um material excelente para remoção de Cr (VI) em soluções aquosas.

As características intrínsecas da celulose bacteriana favorecem a sua utilização em processos de separação. Nesse sentido, Liu *et al.* (2017) utilizaram membrana de celulose bacteriana modificada com proteína de soja isolada para a filtração de partículas do ar. Os autores obtiveram uma membrana eficiente na limpeza do ar removendo 99% das partículas em suspensão.

Wanichapichart *et al.* (2002) estudaram o coeficiente de permeabilidade da celulose bacteriana com diferentes tempos de cultivo, para filtração do fitoplâncton *Chlorella sp.*, uma microalga verde unicelular presente, geralmente, em solos e ambientes aquáticos.

Takai *et al.*, (1991) modificaram celulose bacteriana com quitina para separação de polietilenoglicol (PEG).

Neste trabalho, membranas de celulose bacteriana e os compósitos de celulose/sílica foram utilizadas como filtro para descontaminação de água, aliando os benefícios da celulose bacteriana que é um material altamente poroso, com tamanho de poro inferior à *E. coli*, a capacidade de funcionalização da sílica, tornando as membranas versáteis e robustas, capazes de filtrar não só micro-organismos, mas uma grande variedade de efluentes. Os resultados obtidos com a filtração das membranas de celulose bacteriana foram comparados a filtrações realizadas com uma membrana comercial (0,22 µm de diâmetro de poro e 150 µm de espessura) composta por mistura de ésteres de celulose, utilizada frequentemente para filtração esterilizante em microbiologia.

As membranas produzidas foram testadas em amostras com alta concentração de *E. coli* (10^8 células/mL) que simulam um efluente sanitário (Payment *et al.*, 2001) e em amostras naturais coletadas em diferentes pontos da bacia hidrográfica do rio Igarassu e Jaboatão, situada no litoral norte e sul da do estado de Pernambuco, respectivamente. Os respectivos locais de coleta recebem efluentes das indústrias têxtil, alimentícia, metalúrgica e sucroalcooleira situadas na região, bem como, a despejo de esgoto doméstico (CPRH, 2016).

Não há relatos na literatura sobre o estudo da capacidade filtrante de membranas de celulose bacteriana e nanocompósitos de celulose/sílica para retenção de *Escherichia coli* nem filtração de amostras de águas fluviais contaminadas.

1.5 FERIDAS CRÔNICAS E O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, constituindo cerca de 15% do peso corporal. É composta por três camadas de tecidos denominadas de epiderme (mais externa), derme e a hipoderme. Quando lesões são geradas, há perdas de tecidos com interrupção da estrutura e função normais do órgão, podendo causar sérios danos à saúde do indivíduo. Quando essas lesões são de difícil cicatrização, levando mais de três meses para a regeneração dos tecidos, recebem a denominação de feridas crônicas (VIEIRA e ARAÚJO, 2018; COLTRO *et al.*, 2011).

A ocorrência de feridas crônicas é um problema de saúde pública no mundo inteiro. De acordo com Sen *et al.* (2011), nos Estados Unidos, cerca de 6,5 milhões

de pessoas são acometidas por feridas crônicas levando a um gasto anual de 25 bilhões de dólares (SEN *et al.*, 2009). No Brasil, a prevalência de pacientes com feridas desse tipo tem crescido devido ao aumento da expectativa de vida dos pacientes com doenças como a diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e câncer (COLTRO *et al.*, 2011).

Albuquerque e Alves (2011) afirmam que não há um estudo estatístico consolidado sobre a prevalência de feridas crônicas entre os pacientes brasileiros, por falta de registro nos prontuários hospitalares. Sabe-se, porém, que os custos de pacientes que desenvolvem úlceras crônicas são elevados e pode estar associado a longo tempo de internação causando infecções graves, ocasionado muitas vezes a morte.

As queimaduras são tradicionalmente separadas do grupo de feridas crônicas, por ser tratar de uma condição especial, cujo tratamento é realizado em centros especializados de queimados (FERREIRA *et al.*, 2006). Essa separação não retira a complexidade e a gravidade dessas lesões que acometem cerca de 1 milhão de pessoas por ano no Brasil, dos quais aproximadamente 2500 vão a óbito, de acordo com a Sociedade Brasileira de Queimados. Segundo Henrique *et al.* (2013), dentre os pacientes com queimaduras que desenvolvem infecções, 75% morrem por complicações associadas a pneumonia e a sepse (infecção generalizada).

O processo de cicatrização de feridas é complexo e dinâmico envolvendo vários eventos bioquímicos para que ocorra a restituição do tecido. A cicatrização é constituída por 4 fases sequenciais: Hemóstase que ocorre durante a lesão e pode durar várias horas, a fase inflamatória que dura de 1 a 3 dias, a fase proliferativa que pode atingir de 4 a 21 dias, e a fase mais longa denominada de remodelação que inicia a partir do 21º dia e pode chegar a 1 ano (LANDÉN; LI; STAHL, 2016; MENKE, 2008).

A hemóstase, é a ação ou efeito de estancar uma hemorragia, ocorre logo após a danificação dos tecidos, com formação de coágulos constituídos por plaquetas, hemácias e fibrinas, trazidas pelo sangramento. Os coágulos se aderem as bordas das feridas, formando uma barreira estabilizante (LANDÉN; LI; STAHL, 2016).

Na fase inflamatória, segundo estágio do processo de cicatrização, há um aumento da vasodilatação e permeabilidade vascular com migração de células através de mediadores bioquímicos que facilitam a liberação do exsudato. Nessa fase, o organismo se encarrega de remover tecidos desvitalizados, havendo recrutamento

dos fibroblastos que tem como principal função sintetizar colágeno e elastina dando início a reconstituição da área lesionada (MENKE et al., 2008).

O início da re-epitelização marca a terceira fase da cicatrização da pele, mediado por um processo complexo chamado proliferação. A principal característica desse processo é a formação do tecido de granulação e reestruturação da integridade da derme devido à proliferação de fibroblastos e células endoteliais vasculares (TAZIMA; ANDRADE; MORIYA, 2008).

A última fase, a remodelação, tem início com o fim do desenvolvimento do tecido de granulação e é clinicamente a mais importante. Há nessa fase maior taxa de produção de colágeno que possui maior espessura e substitui a matriz fina formada nos processos anteriores dando lugar a cicatriz o que finaliza o processo de cicatrização (LOPES, 2015).

1.6 MECANISMO DE AÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Nanopartículas de prata são conhecidas por seu efeito bactericida e bacteriostático para um amplo espectro de micro-organismos incluindo bactérias que adquiriram resistência a antibióticos (PINTO et al., 2009; WU et al., 2014).

A ação bactericida da prata não é completamente elucidada, possuindo várias propostas de mecanismos entre os pesquisadores acerca da sua atuação na inibição bacteriana. De acordo com Rai; Yadav; Gade (2009) e Noronha et al. (2017) a prata em seu estado metálico é pouco reativa, mas, quando em contato com fluidos corporais é oxidada a Ag^+ e interage com proteínas, membranas e organelas vitais para a bactéria. Por possuir afinidade por compostos com nitrogênio, fósforo e enxofre, o íon Ag^+ reage com enzimas importantes para a respiração celular, inativando-as (CASTELLANO et al., 2007; NORONHA et al., 2017).

Íons prata interagem, também, com a parede celular e membrana citoplasmática das bactérias; constituídas por peptídeoglicano, alterando a sua permeabilidade, formando pequenos orifícios na sua estrutura, desregulando o transporte entre a membrana e o citoplasma (SONDI; SONDI, 2004; MORONES et al., 2005). As nanopartículas de prata, podem ainda, penetrar nas células e ao chegar no citoplasma celular liga-se ao DNA bacteriano impedindo a sua replicação (FENG et al., 2000).

De acordo com Rai; Yadav; Gade (2009) e Jung *et al.* (2009) o potencial bactericida das nanopartículas pode estar associado ao seu tamanho. Os pesquisadores afirmam que nanopartículas de prata menores possuem maior interação com as bactérias do que partículas maiores devido à sua grande área superficial. Dessa forma nanopartículas com tamanhos inferiores a 10 nm possuem maior ação antimicrobiana do que nanoestruturas maiores (MORONES *et al.*, 2005).

Além das aplicações no combate as infecções, as NPAg estão presentes em uma série de xampus/sabonetes com intuito de adicionar uma ação antimicrobiana ao produto (BANSOD, *et al.*, 2015), no tratamento de cáries (SANTOS *et al.*, 2014; NORONHA *et al.*, 2017), na indústria têxtil (XUE *et al.*, 2012), embalagens para alimentos (MOURA; MATTOSO; ZUCOLOTTI, 2012), na constituição de travesseiros, meias, lenços umedecidos e muitos outros produtos utilizados atualmente pela sociedade (PRABHU e POULOSE, 2012). Essa exposição às nanopartículas tem gerado grande controvérsia na literatura sobre a toxicidade das NPAg. Um dos problemas de saúde causado pela exposição à prata por longo tempo é a argiria. Pacientes com essa rara doença possuem a pigmentação da pele e dos olhos alterada, apresentando uma coloração azul-acinzentada. De acordo com Lacastre; Lobo; João (2013) casos de morbi/mortalidade causados pela argiria são extremamente raros, porque necessita de uma grande ingestão de prata para ocorrer.

Kwon *et al.*, 2009 afirma que a argiria só se desenvolve após ingestão de prata ou por implantação de instrumentos médicos. Chung *et al.* (2010) relataram casos clínicos onde pacientes desenvolveram argiria após a ingestão de nanopartículas de prata coloidal diariamente por 2 anos em média, com doses diárias 40 vezes maior do que o recomendado pela EPA (*Environmental protection agency*) que é de 0,005 mg/Kg/dia. Os pacientes relatados não faziam tratamento hospitalar nem possuíam recomendação médica para administração das nanopartículas, eles utilizaram formulações, sem nenhum controle farmacêutico como automedicação, chegando a ingerir até 1 litro de NPAg por dia.

Embora alguns pesquisadores defendam a hipótese de que a NPAg causa problemas no metabolismo humano (JONES; HOEK, 2010; RAI; GADE, 2009) estudos revelam que nanopartículas de prata não causa danos à saúde do indivíduo. Travan *et al.* (2009) avaliaram a citotoxicidade das nanopartículas de prata imobilizadas em quitosana a partir de experimentos com linhagens celulares de fibroblastos de ratos, hepatocarcinoma e osteocarcinoma de humanos. O material

avaliado demonstrou ação bactericida para bactérias gram positivas e gram negativas, mas não apresentou nenhuma toxicidade as linhagens celulares analisadas. Os autores acreditam que a atividade antimicrobiana do material ocorre por contato com a bactéria, não apresentando nenhum risco a saúde já que não é absorvido pelas células eucarióticas analisadas.

Muger *et al.* (2014) estudaram a toxicidade das nanopartículas de prata a partir de ensaios clínicos em humanos. Os pacientes ingeriram 100 µg/dia de NPAg (grupo A) e 480 µg/dia (grupo B) durante 14 dias. Os exames clínicos não mostraram alterações significativas no metabolismo dos indivíduos.

Formulações contendo nanopartículas de prata e quitosana tem sido utilizada para o tratamento de cárie em crianças sem causar nenhum efeito tóxico em humanos (SANTOS *et al.*, 2014, TARGINO *et al.*, 2014). Flores (2015) preparou diferentes formulações de nanopartículas de prata, estabilizadas com quitosana, para o tratamento de cárie. O estudo clínico realizado com 60 crianças tratadas com essas formulações, mostrou que as NPAg apresentaram atividade biocida para o *Streptococcus mutans*, principal causador de cárie, e não apresentaram riscos à saúde dos pacientes.

Nesse trabalho, nanopartículas de prata foram adicionadas a celulose bacteriana modificada com sililantes contendo grupos aminos, a fim de ancorar as nanopartículas evitando a sua lixiviação descontrolada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Produzir membranas filtrantes a partir da celulose bacteriana/sílica e desenvolver novos curativos com propriedade antimicrobianas baseados em celulose bacteriana modificadas com agentes sililantes e nanopartículas de prata.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar membranas de celulose bacteriana;
- Produzir nanocompósitos de celulose bacteriana/sílica;
- Estudar a capacidade filtrante das membranas produzidas, utilizando amostras com elevada concentração de *Escherichia coli* produzidas em laboratório, como também amostras da bacia hidrográfica do rio Igarassu e Jaboatão;
- Comparar a capacidade filtrante dos materiais produzidos com membranas comerciais (com tamanho de poro de 0,22 µm) destinadas a filtração de micro-organismos.
- Produzir e caracterizar celulose bacteriana modificada com 3-aminopropil-trimetoxissilano (APTS), 3-2-aminoetilamino-propil-trimetoxissilano (DPTS) e N-3-trimetoxissililpropil-dietilenotriamina (TPTS);
- Preparar nanocompósitos de celulose bacteriana com nanopartículas de prata preparadas *in-situ*;
- Estudar a liberação das nanopartículas de prata;
- Investigar a atividade antimicrobiana dos compósitos produzidos para bactérias (*E. coli*, *P. aeruginosas*, *S. aureus*, *S. epidermides*) em ensaios *in vitro*.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS UTILIZADOS: SOLVENTES E REAGENTES

Os reagentes utilizados para a produção e modificação da celulose bacteriana estão dispostos na Quadro 02. Não foi realizada nenhuma purificação prévia dos reagentes e solventes.

Quadro 02- Lista dos reagentes e solventes utilizados na produção e modificação da celulose bacteriana com sílica.

Reagentes	Procedência
Ácido Succínico (99%)	Química Moderna
Ágar Muller Hinton	Kasvi
Álcool Etílico (99,8%)	Neon
Ágar Mueller Hinton	KASVI
Borohidreto de sódio (98%)	Aldrich
Caldo EC	Acumedia
Caldo Lactosado	Kasvi
Caldo BHI (<i>Brain Heart Infusion</i>)	TM Media
Caldo verde Brilhante e bile (2%)	Kasvi
Extrato de levedura	Himedia
Fosfato de Sódio Monobásico Anidro (99%)	Dinâmica
Glicerol (99,5%)	Alphatec
Hidróxido de Sódio (99,7%)	Dinâmica
Membrana de Acetato de Celulose (0,22 µm)	Millipore
Tetraetilortosilano (99%)	Sigma Aldrich
Tetraborato de Sódio decahidratado (99,5%)	Dinâmica
3-aminopropil-trimetoxisilano (APTS)	Aldrich
3-2-aminoetilamino-propil-trimetoxisilano (DPTS)	Aldrich
Nitrato de Prata (99,8%)	Cennabras
N-3-trimetoxisililpropil-dietilenotriamina (TPTS)	Aldrich

3.2 PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA

A celulose bacteriana (CB) foi produzida utilizando meio de cultura do tipo Hestrin–Schramm (Hestrin; Schramm, 1954) modificado com glicerol. Meios de cultura dessa natureza possuem nutrientes como carbono, nitrogênio, ácido e são amplamente utilizados para a produção de celulose. O meio de cultura utilizado era composto por glicerol (30 g L^{-1}) extrato de levedura (16 g L^{-1}), fosfato de sódio (4 g L^{-1}) e ácido succínico ($3,5 \text{ g L}^{-1}$). Após a preparação, a mistura foi distribuída em tubos de ensaio e em frascos de borosilicato de 250 mL para esterilização em autoclave a 121°C durante 20 minutos. O micro-organismo utilizado foi o *Gluconacetobacter xylinus* (ATCC 23769) adquirida da Fundação André Tosello, Campinas, São Paulo. Para a ativação da bactéria foram distribuídos em tubos de ensaio 9,0 mL do meio de cultura e 1,0 mL do inóculo. Os tubos de ensaio foram incubados em repouso a 30°C durante 24 horas. Após o tempo requerido, 1,0 mL do inóculo produzido anteriormente foi novamente adicionado a 9,0 mL do meio de cultura estéril e a suspensão foi incubada sob as mesmas condições. Esse procedimento foi repetido três vezes. Por fim, mantendo sempre a proporção de 10% em volume de inóculo, foram produzidas as membranas em frascos de borosilicato de 250 mL. Após a inoculação, os frascos foram incubados a 30°C e as membranas foram retiradas assepticamente após 72 horas de cultivo. A lavagem das membranas foi realizada em banho-maria (80°C) com solução de NaOH ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$) para a retirada das células e meio de cultura. O pH foi ajustado para 7,00 após sucessivas lavagens com água destilada.

3.2.1 Rendimento das produções de celulose bacteriana

Frascos de borosilicato de 250 mL com meio de cultura com e sem microrganismos foram incubados com o intuito de acompanhar o consumo de glicerol pela *Gluconacetobacter xylinus*. Após três dias de incubação, a membrana de CB formada foi retirada assepticamente juntamente a uma alíquota de 1,50 mL do meio de cultura para análise. As amostras foram diluídas em água deionizada na proporção de 1:10 e filtradas com membranas de $0,22 \mu\text{m}$. Os inóculos e o branco foram analisados no Centro de tecnologia Estratégica do Nordeste (CETENE) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), modelo Alliance e 2695 Waters, coluna

Hi-Plex por exclusão molecular, vazão 0,6 ml/min com volume de injeção de 20 µL, detector de Índice de Refração (IR), 2414, Waters.

A taxa de produção da celulose e o rendimento foram calculados de acordo com procedimento proposto por Gomes *et al.* (2013), correlacionando a massa da fonte de carbono do substrato utilizado no meio de cultura, e a massa de celulose seca produzida.

- Taxa de Produção da celulose bacteriana ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$): $\text{TP}_{\text{CB}} = m_{\text{CB}} / (v \cdot t)$
- Rendimento da Produção da celulose bacteriana: $R = (m_{\text{BC}}/v) / (s_i - s_f) \times 100$

Onde: m_{CB} é a massa de celulose produzida em (g), v é o volume em litros e t o tempo de cultivo em horas, s_i é a concentração inicial do substrato (g L^{-1}) e s_f a concentração final.

3.3 MODIFICAÇÃO DA MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA COM SÍLICA

Membranas de celulose bacteriana após três dias de incubação foram imersas em 20 mL de NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (CBSiB1); $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (CBSiB2) ou $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (CBSiB3), contendo 100 mg de borato de sódio durante 5 horas a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi removida da solução, lavada com água deionizada, seca com papel absorvente e imersa em 20 mL de solução etanólica $0,40 \text{ mol L}^{-1}$ de TEOS (precursor da sílica). A reação permaneceu durante 24 horas sem agitação em temperatura ambiente. Por fim, a membrana modificada foi lavada com solução 1:1 etanol/água em mesa agitadora a 120 rpm três vezes por 30 minutos.

3.4 PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIOLÓGICA UTILIZADA PARA FILTRAÇÃO

Escherichia coli, oriunda do Departamento de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco registrada com código (UFPEDA 224), foi utilizada para preparação da suspensão bacteriológicas utilizadas nas filtrações. O inóculo foi repicado em ágar Mueller Hinton e incubado a 35°C por 24 horas. Após a incubação os micro-organismos foram retirados da placa com ajuda de uma alça de platina e suspensos em água destilada estéril. Foi padronizada uma absorbância inicial de 0,66 para todas as suspensões o que correspondia a uma ordem de grandeza de 10^8

células de *E. coli* por mL de acordo com a contagem na câmara de Neubauer. A suspensão de bactéria produzida e o filtrado foram analisados no espectrofotômetro modelo Thermo Biomatec com leitura em 660 nm (YOKOIGAWA *et al.*, 1996, OTTO *et al.*, 2002) utilizando água destilada estéril como branco e em microscópio óptico modelo Leica CME para contagem das bactérias em câmara de Neubauer.

3.5 ESTUDO DA CAPACIDADE FILTRANTE DA CELULOSE BACTERIANA E NANOCOMPÓSITO CELULOSE/SÍLICA NA DESCONTAMINAÇÃO DA ÁGUA

As membranas de celulose bacteriana modificadas foram testadas quanto a sua capacidade filtrante utilizando amostras de água coletadas em pontos da bacia hidrográfica de Igarassu e suspensões concentradas de *Escherichia coli* na ordem de 10^8 cel/mL produzidas em laboratório que simulam um efluente sanitário (PAYMENT; PLANTE; CEJKA, 2001).

As filtrações foram realizadas com CB, CB modificada e membranas comerciais compostas por mistura de ésteres de celulose com 0,22 µm de diâmetro de poro e 150 µm de espessura (de acordo com especificação do fabricante) a fim de comparar os resultados obtidos, já que elas são utilizadas para filtrações esterilizantes e estão disponíveis comercialmente. Cada membrana utilizada no experimento com suspensões de *E. coli* foi estudada quanto a saturação da capacidade filtrante, sendo realizada dez filtrações subsequentes. Após cada filtração o filtrado foi submetido à leitura no espectrofotômetro UV-Vis e contagem direta das células por microscopia óptica com auxílio da câmara de Neubauer.

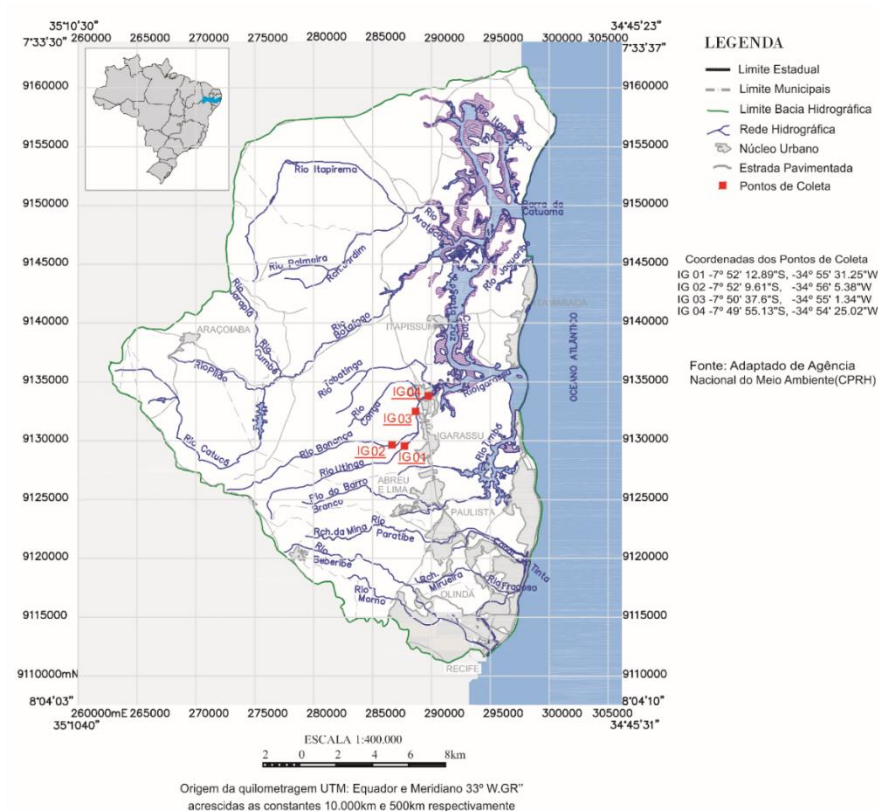
Para todos os experimentos da filtração as membranas (CB, CBSiB1, CBSiB2, CBSiB3 e a membrana comercial) foram dispostas assepticamente em suporte de policarbonato (sistema Sartorius 16510) acoplado a uma bomba de vácuo. As filtrações foram realizadas com 100,0 mL das amostras do rio Igarassu ou 10 mL da suspensão de *Escherichia coli*. A água dos rios utilizados nesse experimento foi coletada em outubro/2018 pela Agência Estadual do Meio Ambiente (CPRH) e as análises foram realizadas no mesmo dia da coleta. Os pontos de amostragem estão destacados em vermelho no mapa descrito na Figura 12.

A avaliação da eficiência da filtração para as águas da bacia hidrográfica foi realizada pela inoculação de 100 µL das amostras pela técnica *spread plate* em ágar Muller Hinton a 35°C por 24 horas, e, pela técnica do número mais provável

(metodologia tradicional e mundialmente conhecida que fornece a densidade de coliformes totais e termotolerantes em amostras de água) seguindo a metodologia do *Standard Methods for the examination of water and wastewater* (APHA, 2012).

A técnica do número mais provável divide-se em dois testes: o presuntivo e o confirmativo. No teste presuntivo, 15 tubos de ensaio foram divididos em 3 grupos de 5 tubos. Em todos os grupos foram adicionados 10 mL do caldo lactosado e 1,0 mL da amostra. Sendo inoculado em cada grupo amostras com diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}). Os inóculos foram incubados a 35 °C durante 24 horas. Após o tempo requerido a leitura foi realizada observando se houve formação de gás nos tubos de Duran invertidos adicionados em cada tubo de ensaio. Para o teste confirmativo, foram transferidos assepticamente 1,0 mL de cada inóculo utilizado no teste presuntivo, a 10 mL de caldo verde brilhante e bile 2%, incubando-os a 35 °C por 24 horas. Para o teste complementar (com o intuito de quantificar *E. coli*) o mesmo procedimento foi realizado, alterando apenas o meio de cultura que é o caldo EC, seletivo para crescimento de *E. coli*, e a temperatura de incubação 44.5°C específica para essa bactéria (APHA, 2012).

Figura 12- Mapa com localização dos pontos de amostragem da bacia hidrográfica do rio Igarassu, Pernambuco, Brasil.



Fonte: Adaptado de CPRH (2016)

3.6 MODIFICAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA COM OS SILILANTES (APTS, DPTS E TPTS)

Inicialmente, as membranas de celulose bacteriana obtidas após 72 horas de cultivo com 6 cm de diâmetro, foram mergulhadas em 20 mL de solução NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) durante 4 horas a temperatura ambiente. Em seguida, o excesso de solução foi retirado com papel absorvente e as membranas foram mergulhadas em 20 mL de solução etanólica 10% dos sililantes (APTS, DPTS e TPTS) de acordo com a metodologia adaptada de Shao *et al.* (2017). A reação ocorreu a 70°C sem agitação durante 4 horas. Após o tempo requerido as amostras foram lavadas com solução etanólica 1:1 em mesa agitadora a 120 rpm.

3.7 ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA A CELULOSE BACTERIANA MODIFICADA COM SILILANTES

As nanopartículas de prata foram sintetizadas *in situ*, após a modificação das membranas com os sililantes, de acordo com metodologia adaptada de Maneerung *et al.* (2008). Inicialmente as membranas de celulose modificadas e membrana sem modificação foram mergulhadas em 20 mL de solução AgNO_3 20 mmol L^{-1} , durante 4 horas para difundir os íons prata no interior da membrana. Após o tempo requerido as membranas foram lavadas com água deionizada, secas com papel absorvente e mergulhadas em 20 mL de solução NaBH_4 5 mmol L^{-1} por aproximadamente 20 segundos. Por fim o material produzido foi lavado 3 vezes com água deionizada.

3.8 TESTE DE LIBERAÇÃO DA PRATA

Membranas de celulose bacteriana modificadas com sililante e nanopartículas de prata (CBAPTS-Ag, CBDPTS-Ag, CBTPTS-Ag) foram mergulhadas em 50 mL de água deionizada e aquecidos em banho maria a 121°C durante por aproximadamente 20 minutos. O sobrenadante foi analisado pela espectroscopia eletrônica fazendo uma varredura entre 300-800 nm.

3.9 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR

O cultivo dos micro-organismos utilizados no teste de sensibilidade a antimicrobianos foi realizado no laboratório de Microbiologia do departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco.

Foram utilizadas 4 bactérias tipicamente encontradas em feridas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228). As bactérias foram cultivadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) a partir da transferência de 100 µL do inóculo em 9 mL de meio de cultura previamente esterilizado a 121 °C durante 20 minutos. O inóculo foi incubado em estufa bacteriológica por 18 horas a 37 ± 1 °C.

O teste de disco-difusão foi realizado em ágar Muller Hinton segundo o procedimento proposto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Após a ativação dos micro-organismos, uma suspensão bacteriológica com aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL de bactéria, foi preparada de acordo com a escala padrão 0,5 de McFarland e inoculada em placas de Petri estéreis. O inóculo foi espalhado na superfície do ágar com *swab* estéril até o completo recobrimento da placa. Em seguida discos estéreis com 6 mm de diâmetro da CB; CB modificada com sililantes (CBAPTS, CBDPTS, CBTPTS) e CB modificada com sililante e nanopartículas de prata (CB-Ag, CBAPTS-Ag, CBDPT-Ag, CBTPTS-Ag) foram adicionadas nas placas e incubadas a 37 °C (± 1 °C) por 24 horas. O branco foi analisado a partir das membranas de celulose sem modificação e o controle positivo pela análise da CB-Ag. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.10 CARACTERIZAÇÕES

Todas as membranas antes da caracterização foram liofilizadas. Para as análises de espectroscopia de infravermelho e análise térmica as amostras foram picotadas com auxílio de tesoura, almofariz e pistilo até formar um pó.

3.10.1 Análise térmica

As curvas TG foram adquiridas na Universidade Federal Rural de Pernambuco em um equipamento Thermogravimetric Analyzer TGA-50/50H. Todas as amostras foram analisadas em uma faixa de temperatura de 40-500 °C, com fluxo de gás argônio de 50 mL min⁻¹ e taxa de aquecimento de 5 °C min⁻¹.

3.10.2 Difratometria de raios X

Os difratogramas de raios-x foram obtidos em difratômetro de Raios-X, localizado no CETENE, modelo Bruker D8 Advance Davinci, com radiação de Cu-k α (λ = 1,54 Å), em uma taxa de 0,03 ° s⁻¹, e varredura de 5 a 60°. O índice de cristalinidade foi calculado de acordo com intensidade do pico (200) representada pela equação por $I_{(200)}$ e a intensidade mínima entre (200) e (110) representada por $I_{(am)}$ que corresponde apenas a região amorfa e está situada em aproximadamente 18 ° em 2 θ (SEGAL *et al.*, 1959)

$$IC = (I_{(200)} - I_{(am)}) / I_{(200)}$$

3.10.3 Espectroscopia de infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), através de um equipamento Bruker modelo IF66 com transformada de Fourier, fazendo a varredura na região de 4000-400 cm⁻¹, com pastilhas de KBr, e, para as amostras modificadas com sililantes, os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu IR-Tracer com acessório de ATR fazendo uma varredura na região de 4000-600 cm⁻¹.

3.10.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise da morfologia das membranas de celulose bacteriana, para as membranas filtrantes, foi realizada em microscópio eletrônico de varredura modelo Quanta 200 FEG, situado no CETENE. Todas as amostras foram metalizadas em metalizadora Sputter Coater depositando uma fina camada de ouro na superfície da membrana. Para as membranas de celulose modificadas com sililante e

nanopartículas de prata, as imagens foram obtidas no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco em microscópio eletrônico Tescan Mira 3.

3.10.5 Espectroscopia de Absorção Eletrônica (UV-Vis)

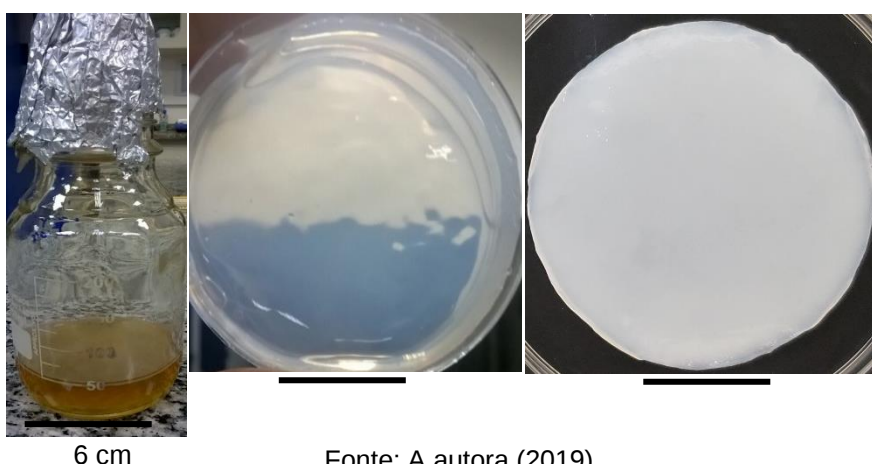
Os espectros da celulose bacteriana modificada com sililantes e nanopartículas de prata foram obtidos no Instituto Federal de Pernambuco em um espectrofotômetro Agilent Cary 60. As medidas referentes ao experimento de liberação das nanopartículas de prata foram realizadas no laboratório de Compostos Híbridos, Interfaces e coloides (CHICO) na UFPE em um espectrofotômetro Ocean Optics modelo DH-2000. Para todas as amostras fez-se uma varredura na região de 300-800 nm em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1cm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO E RENDIMENTO DA CELULOSE BACTERIANA

As membranas de celulose bacteriana utilizadas nos experimentos possuíam 6,0 cm de diâmetro e espessura média de 0,0450 mm. A espessura da membrana foi medida em 10 regiões diferentes utilizando um paquímetro digital Calipiter 300. A Figura 13 mostra a celulose bacteriana produzida na superfície do meio de cultura após 72 horas de incubação (13a), celulose bacteriana purificada (13b), celulose bacteriana modificada com sílica (13 c).

Figura 13- Fotografia da membrana de celulose bacteriana produzida na superfície do meio de cultura (13 a), Membrana de celulose purificada (13 b), Membrana de celulose bacteriana modificada com sílica (13 c).



Fonte: A autora (2019)

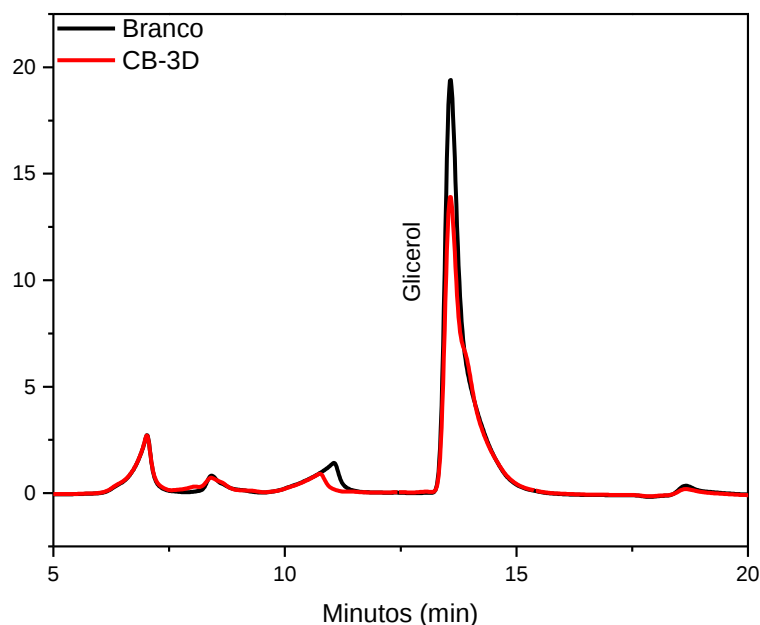
Para as filtrações, foram utilizadas as membranas retiradas após os primeiros 3 dias de cultivo. A Tabela 01 mostra o consumo de glicerol para as produções de celulose bacteriana e a Figura 14 mostra os cromatogramas obtidos.

Tabela 01-Consumo de glicerol durante as produções de celulose bacteriana obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.

	Amostra	Tempo de Retenção (minutos)	Concentração (g L⁻¹)
GLICEROL	Branco	13,58	29.60
	1CB-3D	13,58	24.71

*1CB-3D corresponde a celulose bacteriana produzida durante os três primeiros dias, denominadas como membranas de primeira produção. 2CB-3D corresponde a celulose bacteriana produzida durante os três últimos dias de cultivo, denominadas segunda produção.

Figura 14-Cromatogramas obtidos para quantificação de glicerol presente no meio de cultura durante a produção da CB pela *Gluconacetobacter xylinus*.



Fonte: A autora (2019)

Para 1L de meio de cultura foram produzidas 22 membranas de celulose bacteriana com 6 centímetros de diâmetro, aproximadamente 0,0470g massa seca de celulose contabilizando 1,034 g L⁻¹. Zhong *et al.* (2013) estudaram o efeito de várias fontes de carbono incluindo a glicose e o glicerol na produção de celulose bacteriana utilizando a *Gluconacetobacter xylinus*. O estudo mostrou que a produção de CB foi 2,38 vezes maior para o glicerol do que para a glicose comprovando a eficiência do glicerol na produção da celulose bacteriana.

De forma geral, as bactérias apresentam uma curva de crescimento que se divide em 4 fases (fase lag, log, estacionária e morte celular). A fase lag é uma fase inicial de adaptação, há pouca ou nenhuma divisão celular e uma intensa atividade enzimática preparando-se para o crescimento populacional. A fase log, é o período de intensa divisão celular, há um crescimento exponencial dos microrganismos, momento de maior atividade metabólica. Em seguida, os micro-organismos entram em uma fase estacionária onde há diminuição dessa atividade havendo uma estabilização da população microbiana. Por fim, a curva de crescimento entra em declínio onde o número de morte celular ultrapassa o número das novas células, até uma pequena fração de células vivas ou morte de toda a população (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A formação da celulose bacteriana ocorre concomitante à multiplicação dos micro-organismos e para essas atividades a bactéria necessita consumir os nutrientes provenientes do meio de cultivo. De acordo com Ruka e colaboradores (2012) que estudaram o crescimento da *G. xylinus* em meios de cultura com diferentes composições, não há produção significativa de celulose bacteriana após 14º dia de cultivo, tanto para cultivo estático quanto para cultivo sob agitação. Os pesquisadores observaram ainda que o significativo crescimento dos micro-organismos ocorreu apenas nos 7 primeiros dias após a incubação.

A Tabela 02 mostra os valores da taxa de produção e do rendimento da celulose bacteriana produzida nesse trabalho. Pode-se observar que nos primeiros dias de incubação a bactéria encontra-se extremamente ativa, na fase log, e com grande quantidade de nutrientes disponíveis no meio de cultura favorecendo a produção de celulose bacteriana.

Tabela 02-Valores da taxa de produção e rendimento para as produções de CB.

Produção	Taxa de produção média	Rendimento (m/v)
BC	0,0145 g L ⁻¹ h ⁻¹	21,14%

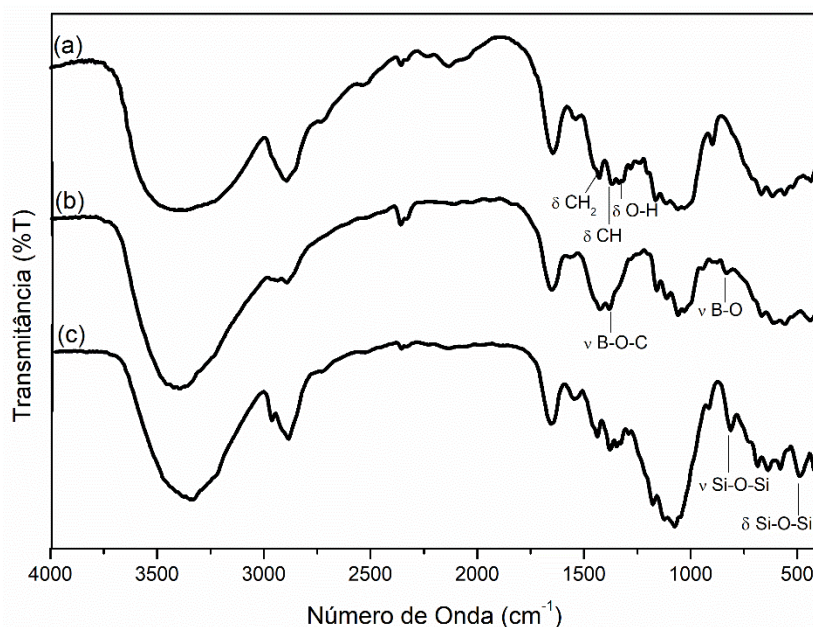
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA E SEUS COMPÓSITOS

A Figura 15 mostra espectro na região do infravermelho da CB, CB após a adição de tetraborato de sódio e CB modificada com sílica (CBSiB1). O espectro de infravermelho das amostras CBSiB2 e CBSiB3 encontra-se no Apêndice A. Para a CB pode-se observar uma banda forte e larga em 3410 cm⁻¹ atribuída a estiramento O-H e ligações de hidrogênio; estiramento em 2896 cm⁻¹ de CH₂; deformação angular de ligações de hidrogênio em 1643 cm⁻¹; deformação angular simétrica de CH₂ e C-H em 1427 cm⁻¹ e 1369 cm⁻¹ respectivamente; deformação angular no plano de O-H em 1338 cm⁻¹; deformação angular fora do plano em 1315 cm⁻¹ de CH₂; estiramento assimétrico em 1155 cm⁻¹ atribuído a ligações glicosídicas C-O-C; estiramento em 1111 cm⁻¹ e 1032 cm⁻¹ atribuídos a ligações C-O; deformação angular fora do plano de O-H em 667 e 617 cm⁻¹ (BARUD *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2011; FIGUEIREDO *et al.*, 2015; QIU *et al.*, 2016).

Após a adição do borato de sódio, adicionado como um reagente em ponte para promover ligações covalentes entre a CB e a rede de sílica a ser formada, um novo estiramento aparece em 833 cm^{-1} que corresponde a ligação B-O (GOEL; SINHA; KUMAR, 2013; SPOLJARIC *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2017). Há também uma mudança no perfil da região entre 1427 e 1315 cm^{-1} com surgimento de um novo estiramento em 1346 cm^{-1} que corresponde a ligação B-O-C (Cozzolino *et al.*, 2016) confirmando a ligação entre tetraborato de sódio e celulose. Angelova *et al.* (2011) e Han *et al.* (2014) também reportaram a formação de ligações dessa natureza quando o tetraborato de sódio foi adicionado ao PVA e compósitos de celulose/PVA, respectivamente.

Após a modificação da CB com sílica foi possível observar estiramento simétrico em 794 cm^{-1} que está relacionado a ligações Si-O-Si e deformação angular em 462 cm^{-1} típicas de Si-O-Si (ANGELOVA *et al.*, 2012; ASHORI *et al.*, 2012; BARUD *et al.*, 2008; SAI *et al.*, 2015) confirmando a presença de sílica na CB. Os estiramentos do borato de sódio não são evidenciados após a adição de sílica a membrana devido à sobreposição das bandas.

Figura 15- Espectroscopia na região do infravermelho da celulose bacteriana (a), celulose modificada após adição de tetraborato de sódio (b), e CB/sílica (CBSiB1) (c).

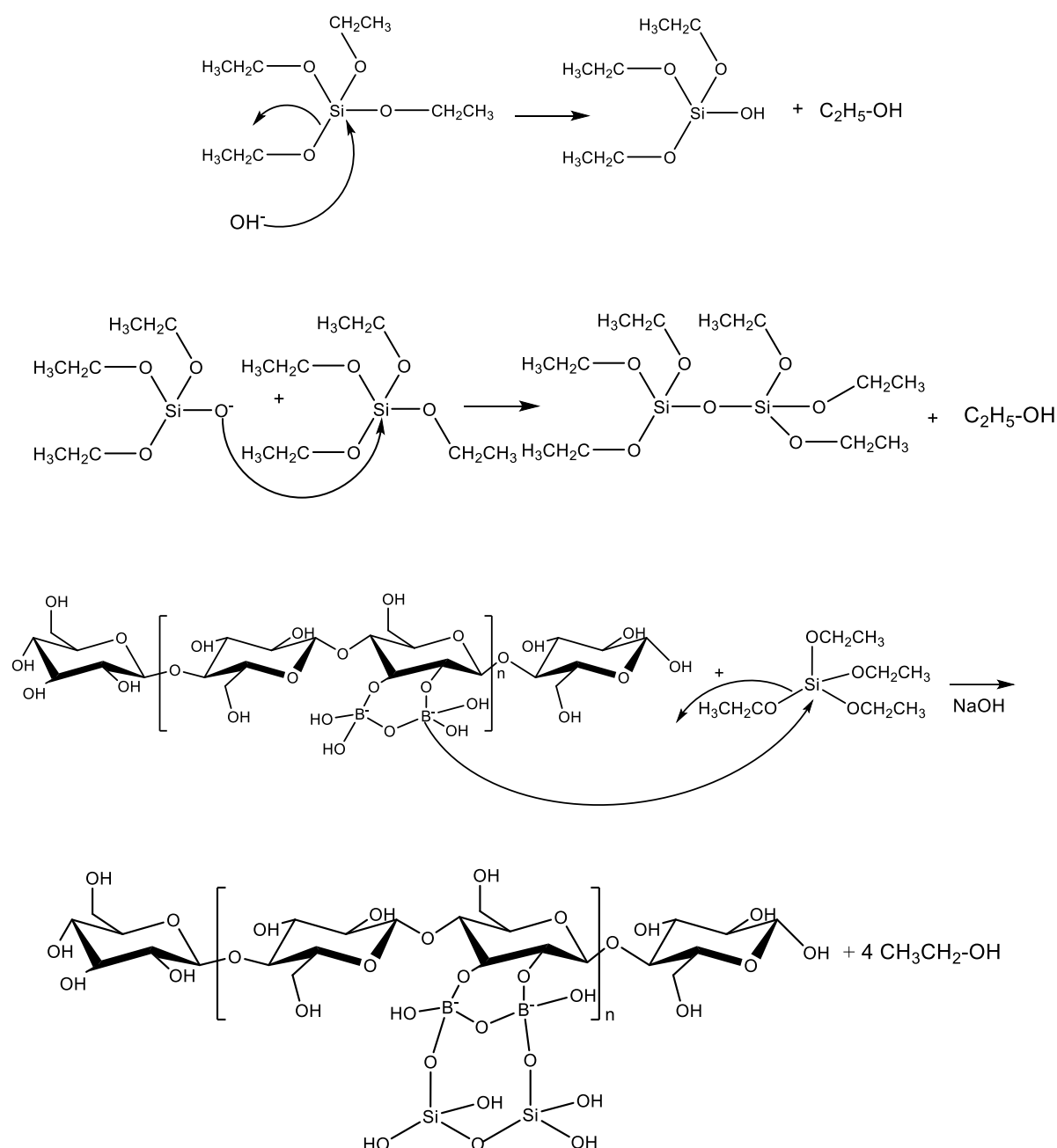


Fonte: A autora (2019)

A espécie (BO_4^-) presente nas nanofibrilas do polímero realiza o ataque nucleofílico ao TEOS, promovendo a formação de uma ligação covalente entre a sílica

e as fibrilas da CB levando a uma distribuição mais homogênea dessas partículas ao longo da Celulose. A Figura 16 propõe a reação entre a celulose bacteriana contendo borato de sódio e TEOS em meio básico.

Figura 16- Proposta de reação para modificação da celulose bacteriana com sílica.

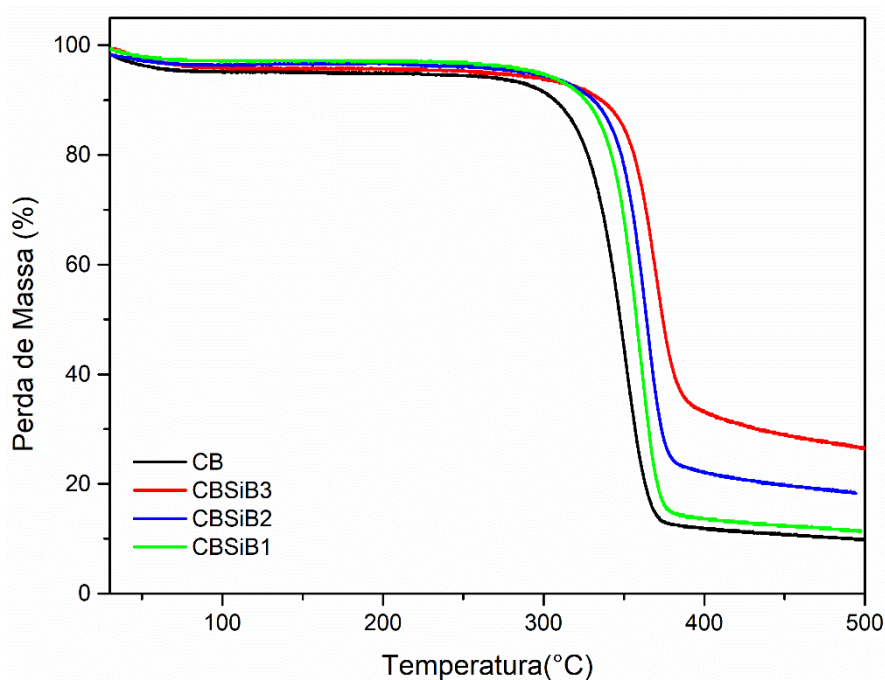


Fonte: A autora (2019)

A Figura 17 mostra as curvas TG obtidas para a celulose bacteriana e os compósitos CB/Sílica. Pode-se observar que todas as amostras apresentaram um

único evento térmico com diferentes perdas de massa atribuídas a degradação da celulose incluindo a despolimerização, desidratação e decomposição de unidades glicosídicas como reportado por Tsalagkas *et al.*, (2016).

Figura 17- Curvas TG da CB, CBSiB1, CBSiB2 e CBSiB3.



Fonte: A autora (2019)

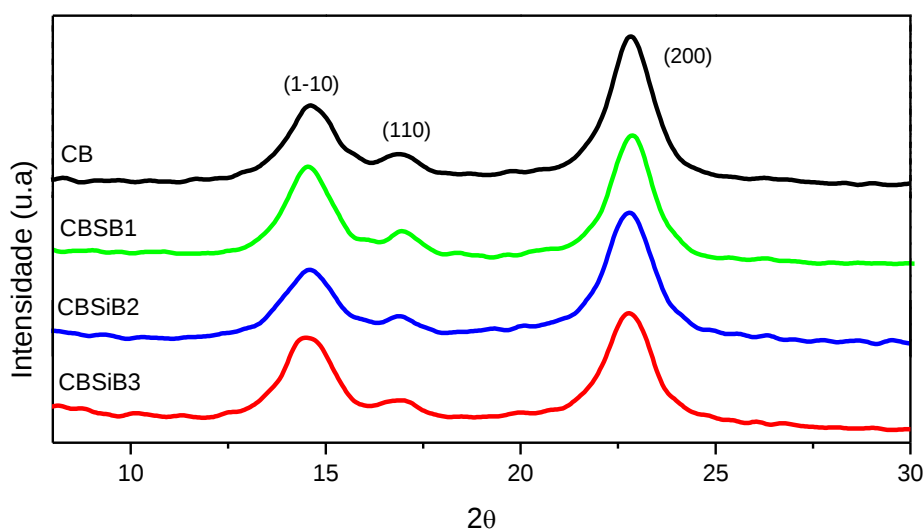
Após a adição da sílica, as amostras apresentaram variação na estabilidade térmica, destacando-se a CBSiB3 que apresentou um aumento na estabilidade térmica de 17°C em relação a CB, como pode ser observado na Tabela 03. De acordo Sheykhnazari *et al.* (2016) o aumento na estabilidade térmica das membranas modificadas está diretamente relacionado a presença da sílica formada após as reações de hidrólise e condensação do TEOS. Estudos realizados por Barud *et al.* (2008) e Sheykhnazari *et al.* (2016), que modificaram celulose bacteriana com sílica corroboram com os resultados obtidos. A partir da análise da massa residual foi possível determinar a quantidade de SiO₂ presente nas amostras sendo 6,54% para a CBSiB1, 14,45 % para CBSiB2 e 33,25% CBSiB3. Esses resultados mostram que a concentração do catalisador influencia diretamente na deposição de sílica na celulose bacteriana. Segundo Aelion e Loebel (1950) a taxa de hidrólise do TEOS é proporcional à concentração do catalisador.

Tabela 03- Comparação da estabilidade térmica e perda de massa da CB, CBSiB1, CBSiB2 e CBSiB3.

Amostra	T _{onset} (°C)	Perda de Massa (%)	Intervalo da Temperatura da Perda de Massa (°C)
CB	335	~ 83,17%	335-364 °C
CBSiB1	348	~ 80,50%	348-373°C
CBSiB2	350	~72,84%	350-381°C
CBSiB3	355	~ 60,06%	352-380°C

Fonte: A autora (2019)

O difratograma de raios-X (Figura 18) da CB e dos compósitos CBSiB1, CBSiB2 e CBSiB3 mostraram os principais picos de difração em 2θ em $14,6^\circ$; $16,8^\circ$ e $22,7^\circ$ que são atribuídos aos planos de difração da celulose I ($1\bar{1}0$), (110), (200) respectivamente (KINGKAEW *et al.*, 2014; SAI *et al.*, 2015; TOMÉ *et al.*, 2010). Comparando os difratogramas pode-se observar que houve a preservação do padrão de difração da CB em todas as amostras, sem deslocamento ou aparecimento de novos picos, sugerindo que a reação ocorreu predominantemente nas regiões amorfas do polímero sem afetar, significativamente, a estrutura cristalina da CB (GUZUN *et al.*, 2014; TOMÉ *et al.*, 2010). Os índices de cristalinidade relativa foram calculados de acordo com o método de Segal *et al.* (1959) e estão dispostos na Tabela 04. Esse parâmetro tem sido usado pelos pesquisadores para avaliar as possíveis alterações na estrutura cristalina da celulose após tratamentos químicos.

Figura 18- Difratogramas da membrana de celulose e compósitos CBSiB1, CBSiB2 e CBSiB3.

Fonte: A autora (2019)

O índice de cristalinidade (IC%) apresentou diminuição com o aumento da deposição de sílica na membrana, sendo a CBSiB3 a amostra que apresentou uma alteração mais significativa. A diminuição no índice de cristalinidade da celulose após modificação com quitosana, sílica e alginato também foi reportada por Kim *et al.*, (2011); Sai *et al.*, (2015) e Suratago *et al.*, (2015), respectivamente. De acordo com Suratago *et al.* (2015) a diminuição do índice de cristalinidade ocorre devido à ruptura das ligações de hidrogênio que compõem as regiões microcristalinas da CB quando a modificação é adicionada.

Tabela 04- Índice de cristalinidade (IC%) da celulose bacteriana e celulose bacteriana modificada (CBSiB1), (CBSiB2) e (CBSiB3).

Amostra	IC (%)
CB	85, 92
CBSiB1	85,10
CBSiB2	83,67
CBSiB3	79,62

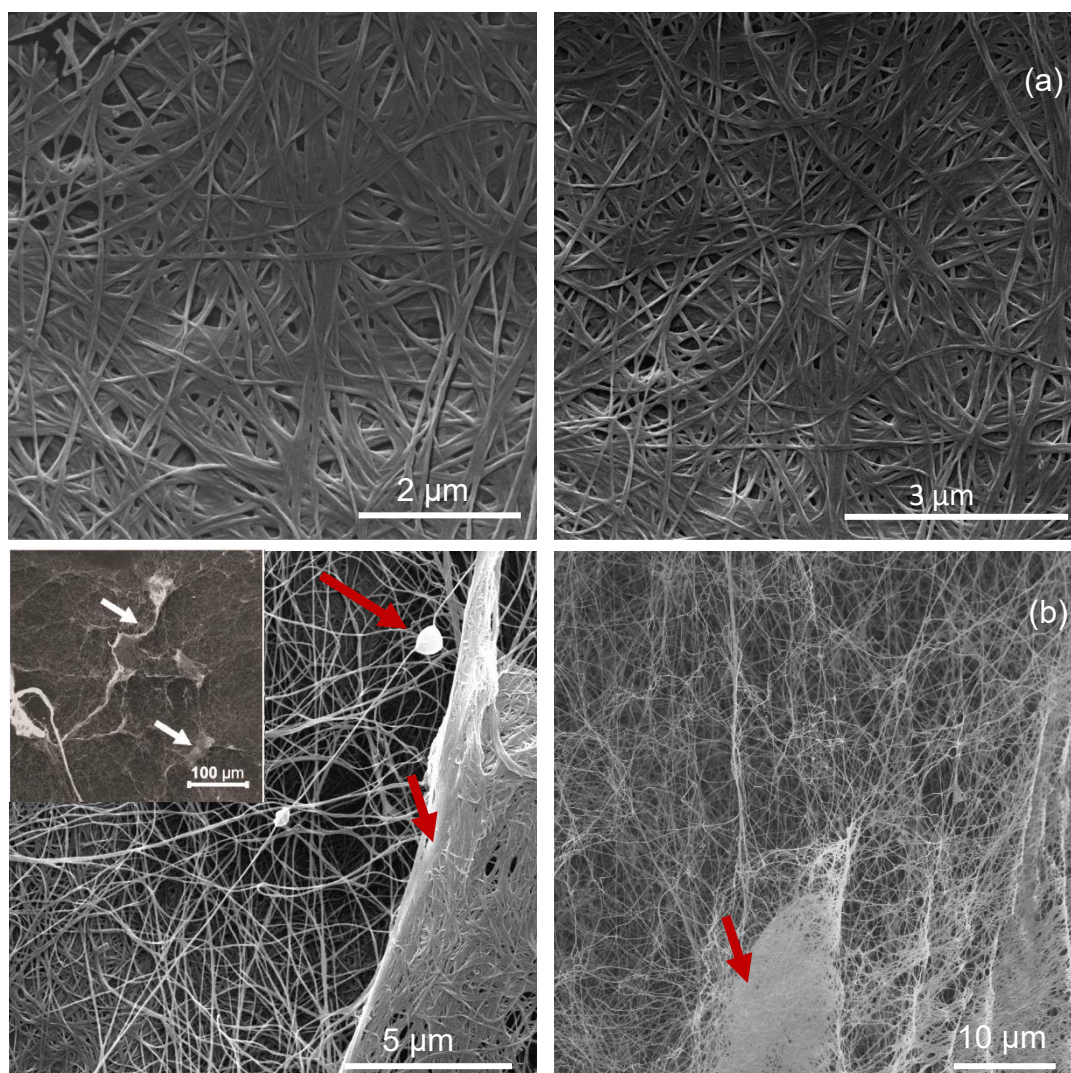
Fonte: A autora (2019)

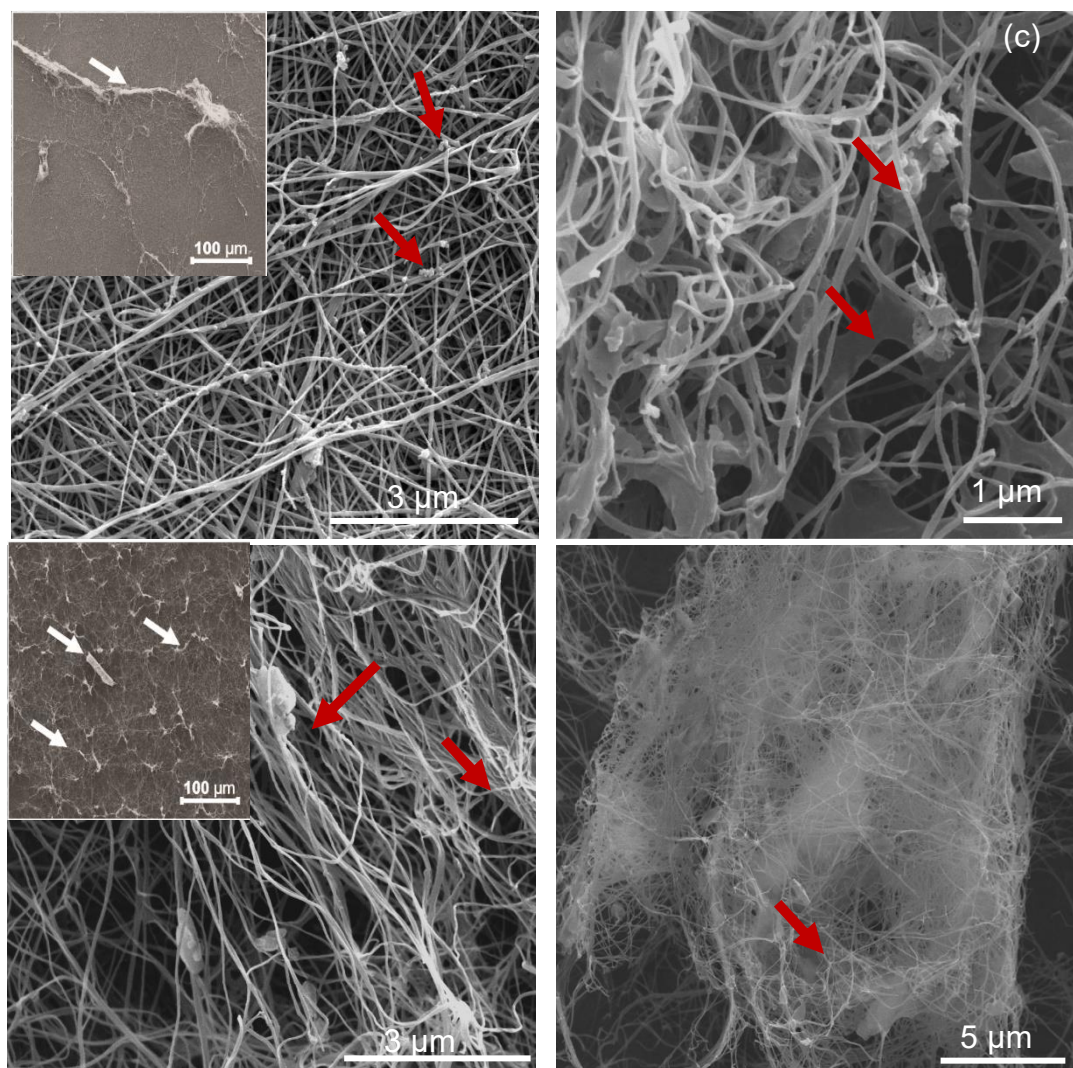
A Figura 19 mostra as imagens da microscopia eletrônica de varredura para a CB e CB/sílica compósitos. Pode-se observar que a CB possui nanofibrilas alongadas compostas por monômeros de glicose unidos por ligações do tipo β -1,4 que possui uma estrutura tridimensional randômica como descrito previamente na literatura (KIM *et al.*, 2011; NAPAICHAYANUN *et al.*, 2015; STUMPF *et al.*, 2018; SULAEVA *et al.*, 2015).

Após a adição do TEOS houve uma alteração significativa na morfologia das membranas. Para todas as amostras, foi possível observar partículas esféricas de sílica que estão no intervalo de 0,744-0,304 μm para BCSiB1; 0,278-0,023 μm para BCSiB2 e 0,390-0,265 μm para BCSiB3. Além das partículas de sílica, a modificação pode ser observada também pelo recobrimento das fibrilas como destacado nas imagens pelas setas vermelhas. Quanto maior a concentração do catalisador (NaOH) maior é a distribuição de sílica na amostra como pode ser observado na Figura 20(d) que corresponde a CBSiB3. A amostra CBSiB3 mostra o maior revestimento das nanofibrilas de celulose com sílica, como consequência da maior concentração do catalisador corroborando com os resultados obtidos pelas curvas TG. As setas brancas nos *insets* das microscopias indicam a distribuição da sílica na membrana quando imagens foram obtidas com menor magnificação. A adição de sílica na

celulose bacteriana foi reportada por Ashori *et al.*, (2012); Barud *et al.*, (2008); Maeda *et al.*, (2006); Sheykhnazari *et al.*, (2016), como uma consequência da reação entre grupos silanóis formados a partir da hidrólise do TEOS e hidroxilas da celulose bacteriana.

Figura 19- Microscopia Eletrônica de Varredura CB (a), CBSiB1 (b), CBSiB2 (c) CBSiB3 (d).





Fonte: A autora (2019)

4.3 APLICAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA E COMPÓSITOS (CBSiB1, CBSiB2 E CBSiB3) COMO MEMBRANA FILTRANTE PARA *E. Coli*

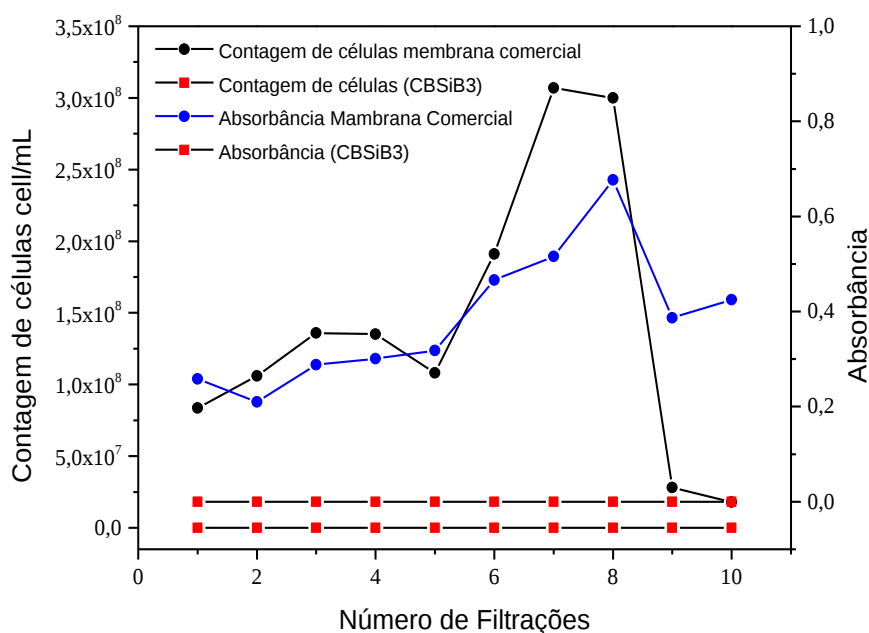
As membranas de celulose bacteriana modificadas foram utilizadas como um filtro para retenção de *Escherichia coli* (que mede aproximadamente 2 µm de comprimento e 0,5 µm de largura) de acordo com Fernández *et al.*, (2015). A *E. coli* foi escolhida por ser um micro-organismo padrão que indica contaminação fecal em águas e efluentes. O intuito das análises foi mensurar a concentração de microrganismos remanescentes da filtração e estudar a capacidade de filtração das membranas produzidas.

A Figura 20 mostra o gráfico obtido para o conjunto das 10 filtrações subsequentes realizadas com a celulose bacteriana modificada (CBSiB3) e membrana

comercial com dois diferentes métodos de estudo, contagem de célula (resultado no lado esquerdo do gráfico) e a absorbância do filtrado (lado direito) em função do número de filtrações realizadas. Vale ressaltar, que todos os experimentos foram realizados em triplicata e o perfil das filtrações para todos os compósitos foi o mesmo, sendo colocado no Apêndice B os resultados obtidos para as demais membranas modificadas CBSiB1 e CBSiB2.

As filtrações realizadas nesse trabalho mostraram que as membranas produzidas possuem excelente capacidade filtrante para suspensões de *E. coli* como pode ser observado na Figura 20. As membranas comerciais apresentaram resultados inferiores quando comparadas a CB modificada com sílica demonstrando saturação desde a primeira filtração. As filtrações realizadas com as membranas comerciais não apresentaram um padrão, havendo sempre muita variação na contagem de células e absorbância do filtrado, demonstrando baixa eficiência na retenção dos micro-organismos.

Figura 20-Resultado das filtrações de suspensões concentradas de *E. coli* realizadas com membrana comercial e membrana de celulose modificada (CBSiB3) contendo a contagem de células a esquerda do gráfico e a absorbância a direita em função do número de filtrações realizadas.



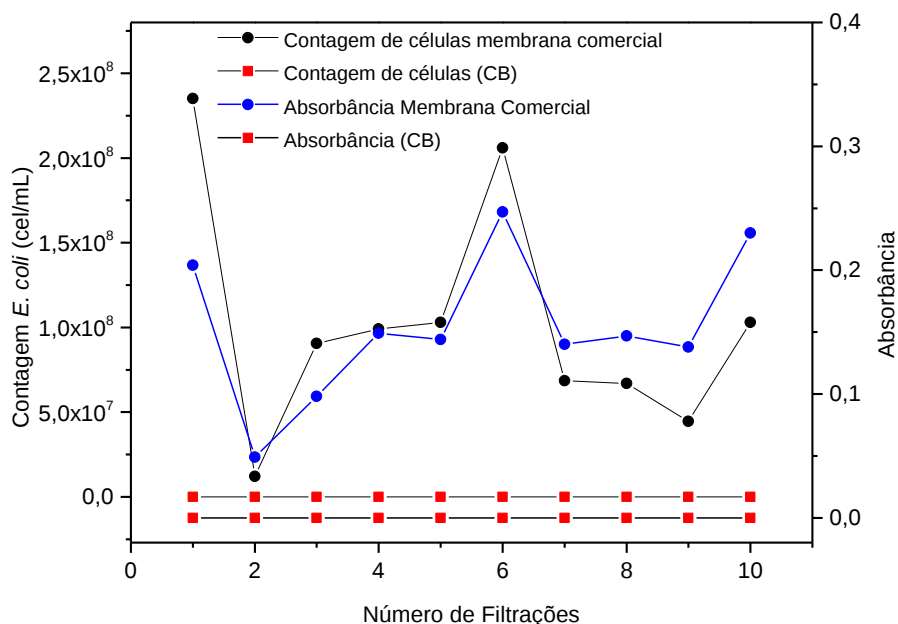
Fonte: A autora (2019)

O filtrado oriundo da filtração com membranas comerciais, analisado por espectroscopia de absorção UV-Vis e microscopia óptica, apresentou altas

absorbâncias e contagem de micro-organismos. A análise dos resultados mostra que as membranas comerciais utilizadas não têm capacidade para filtrar altas concentrações de bactérias diferentemente do que foi observado para a celulose bacteriana modificada. O filtrado analisado após as filtrações usando as membranas de celulose bacteriana modificada apresentou aspecto translúcido com zero de absorbância e ausência de *E.coli* quando a contagem na câmara de Neubauer era executada.

A CB sem modificação também foi submetida ao mesmo procedimento descrito anteriormente para determinação da capacidade filtrante demonstrando comportamento semelhante ao reportado para a CB modificada, como pode ser observado na Figura 21. Os resultados obtidos demonstraram que a excelente capacidade filtrante da celulose bacteriana está relacionada a sua microestrutura composta por nanofibrilas nanométricas oferecendo uma excelente barreira física para retenção de micro-organismos. Todas as filtrações foram realizadas em triplicata e os resultados encontram-se no Apêndice C.

Figura 21- Resultado das filtrações de suspensões concentradas de *E. coli* realizadas com membrana comercial e membrana de celulose bacteriana (CB) contendo a contagem de células a esquerda do gráfico e a absorbância a direita em função do número de filtrações realizadas.



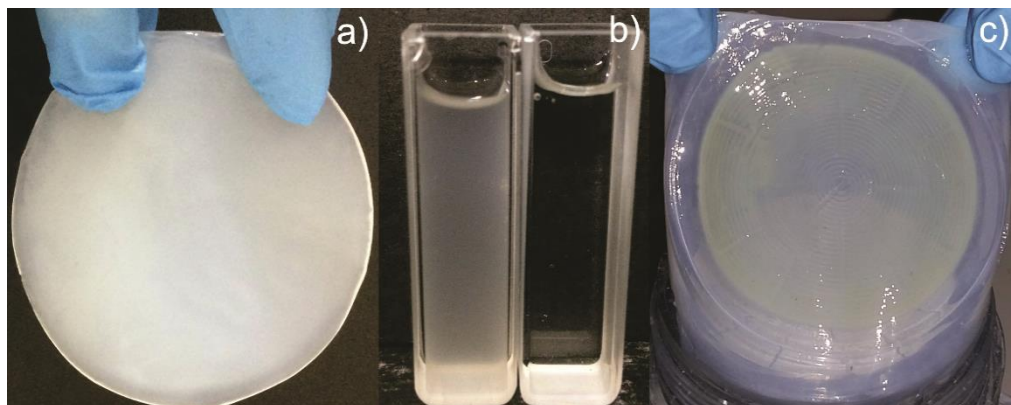
Fonte: A autora (2019)

Todas as membranas constituídas por celulose bacteriana (CB sem modificação e os compósitos) não apresentaram saturação mesmo após 10 filtrações

subsequentes continuando com capacidade filtrante até a décima filtração (limite operacional fixado). Porém, mesmo possuindo capacidade filtrante para micro-organismos semelhantes, o uso da sílica como um agente modificador pode tornar o material ainda mais promissor, abrindo a possibilidade para modificação química da superfície, apresentando-se como uma excelente perspectiva para o tratamento de águas e efluentes com altas cargas de poluição orgânica e microbiológica danosos ao homem e ao meio ambiente.

A Figura 22 mostra fotografias obtidas da membrana modificada (CBSiB3) antes e após as dez filtrações com *E. coli* e da amostra utilizada para filtração antes e após o experimento. Pode-se observar que há uma camada amarela formada por bactérias, que foram retidas pela membrana, e encontra-se espalhada por toda a superfície após a filtração, mostrando a excelente atuação do material como uma barreira física para micro-organismos.

Figura 22- Fotografia da BC/sílica (CBSiB3) (a) antes da filtração; (b) suspensão de *E. coli* antes e após a filtração; (c) Membrana após as dez filtrações.



Fonte: A autora (2019)

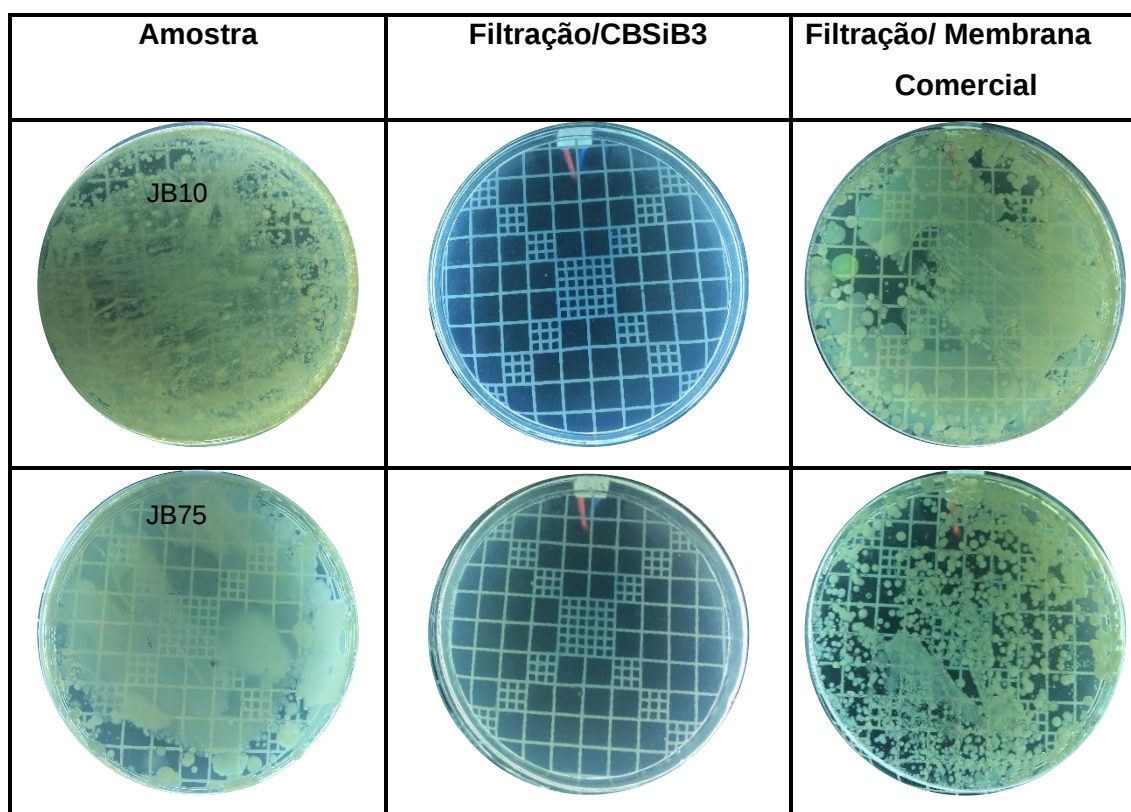
4.4 ESTUDO DA CAPACIDADE FILTRANTE DE AMOSTRAS REAIS COLETADAS NA BACIA HIDROGRÁFICA DE IGARASSU E JABOATÃO

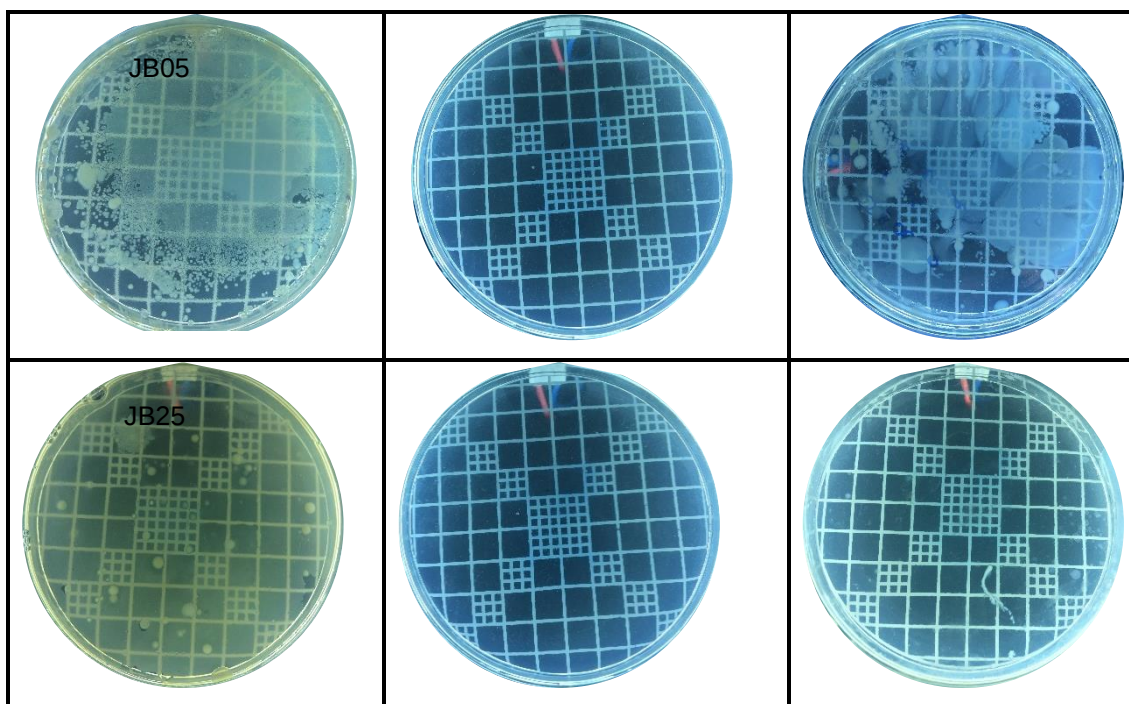
A capacidade filtrante das membranas produzidas também foi estudada com amostras reais coletadas da bacia hidrográfica do rio Igarassu e Jaboatão, que possui maior complexidade microbiológica. Antes da coleta do rio Igarassu, um estudo preliminar para determinar qualitativamente o potencial filtrante das membranas de celulose e celulose modificada foi realizado utilizando a técnica *spread plate*

(plaqueamento dos inóculos pelo espalhamento em superfície) para amostras de água da bacia hidrográfica de Jaboaão. Essa coleta foi executada em outubro/2018 pela Agência Estadual do Meio Ambiente (CPRH). A localização contendo os pontos de coleta das amostras encontra-se no diagrama unifilar disponível no Anexo 01.

De acordo com o CPRH (2016), a bacia hidrográfica de Jaboaão e Igarassu recebe efluentes industriais e domésticos oriundos de indústrias alimentícias, metalúrgica, têxtil, indústria química, papel/ papelão e muitas outras que utilizam os rios para despejar seus rejeitos. A Figura 23 mostra as placas de Petri contendo os resultados obtidos após a incubação das amostras de água fluvial antes e após a filtração com membrana de celulose modificada (CBSiB3) e membranas comerciais de celulose (0,22 μm).

Figura 23- Fotografias das placas de Petri inoculadas com amostras da bacia hidrográfica do rio Jaboaão antes e após a filtração com membrana de celulose bacteriana modificada (CBSiB3) e membrana comercial.





Fonte: A autora (2019)

Como pode ser observado no conjunto de imagens da Figura 23 não houve crescimento de micro-organismos após a filtração das amostras com membranas de celulose modificada (apenas as imagens das placas de Petri da amostra CBSiB3 foi adicionada no texto para evitar extensa repetição dos resultados já que não houve diferença entre as placas inoculadas). Esse resultado motivou a coleta das amostras da bacia hidrográfica do rio Igarassu e o estudo da capacidade filtrante das membranas foi realizado não só pela inoculação em superfície com meio sólido como também, pela determinação da densidade de *Escherichia coli* utilizando a técnica dos tubos múltiplos, denominada de número mais provável (NMP).

A técnica do Número mais provável (NMP) é utilizada para determinação da densidade de coliformes fecais em águas e efluentes, empregada mundialmente como metodologia de referência descrita no *standard methods for the examination of water and wastewater* (APHA, 2012). Nesse trabalho, o NMP foi utilizado para determinar o número mais provável de *Escherichia coli* antes e após as filtrações realizadas tanto com membranas comerciais quanto para CB/Sílica. As análises das amostras foram realizadas pelo laboratório do CPRH e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 05.

Tabela 05-Quantificação de *E. coli* da bacia hidrográfica do rio Igarassu antes e após as filtrações com celulose bacteriana modificada (CBSiB3) e membrana comercial.

Amostra	Antes da Filtração (MPN/100mL)	Após a filtração (BCSiB3) (MPN/100mL)	Após a filtração (M. Comercial) (MPN/100mL)	Intervalo de confiança
IG 01	200	<180	<180	95%
IG 02	1700	<180	<180	95%
IG 03	2200	<180	<180	95%
IG 04	3100	<180	<180	95%

* Valores após filtração foram multiplicados por 100 devido à diluição realizada

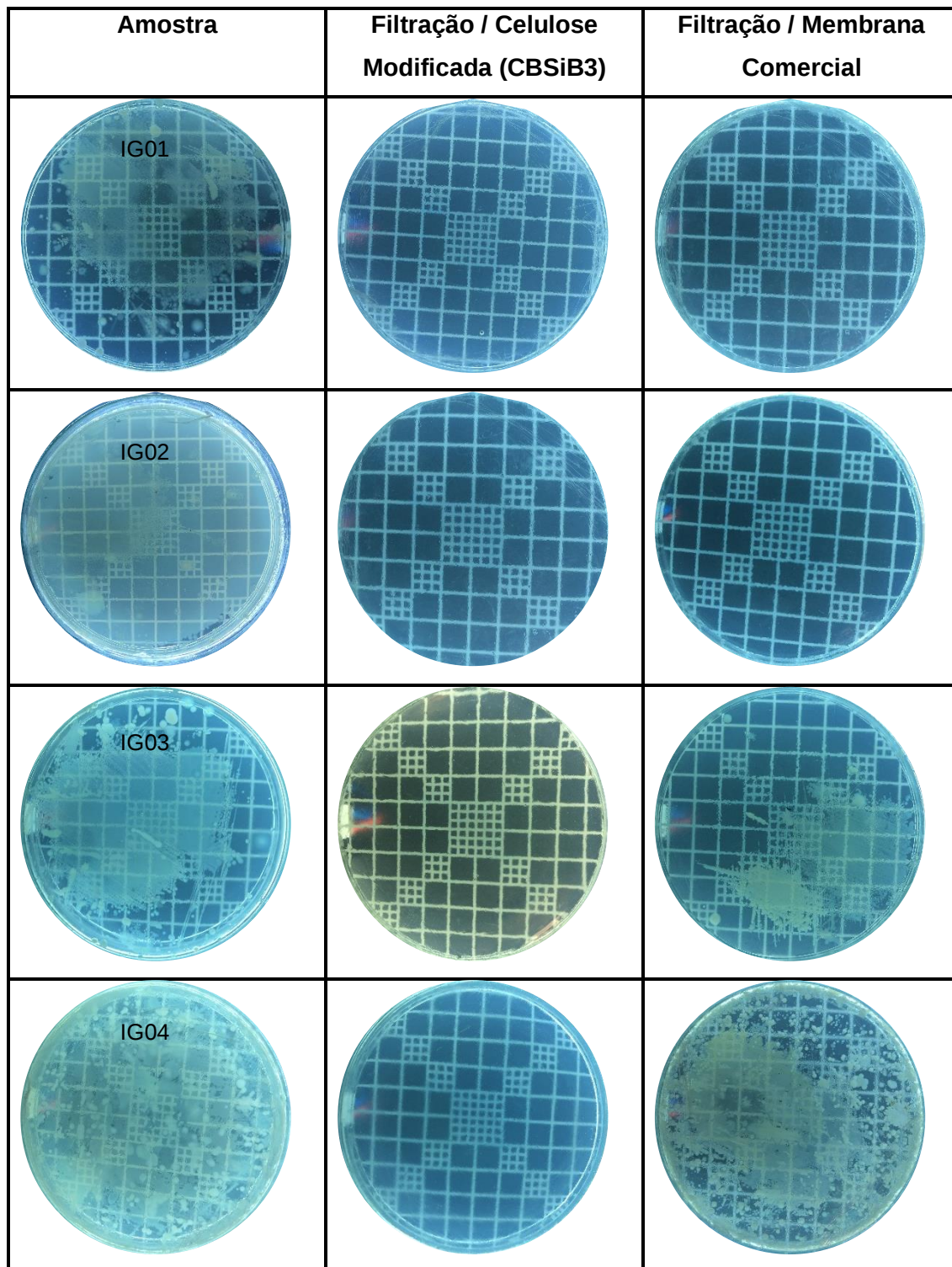
Fonte: CPRH (2018)

A Figura 25 mostra as fotografias retiradas das placas de Petri inoculadas com a amostra e filtrados da bacia hidrográfica de Igarassu. Percebe-se que não houve crescimento de micro-organismos em nenhuma placa após a filtração da água fluvial quando as amostras foram filtradas com membranas de celulose modificada. Esse fato pode ter ocorrido pela inexistência de células microbianas ou inexpressivo número de micro-organismo presente no filtrado abaixo do limite de detecção da técnica de plaqueamento em superfície que é de 10 UFC/ mL (SILVA *et al.*, 2013).

Quando membranas comerciais são utilizadas, pode-se observar crescimento de micro-organismos nas placas que corresponde as amostras IG03 e IG04, que são as que possuem maior contaminação microbiológica de acordo com a técnica dos tubos múltiplos. Os resultados dispostos na Tabela 05 e na Figura 24 confirmam que as membranas comerciais são eficientes para retenção de bactérias em amostras com menor nível de contaminação microbiológica, quando a densidade bacteriana é aumentada as membranas comerciais possuem capacidade de filtração limitada sendo inferior às membranas de celulose bacteriana.

Os resultados obtidos demonstram que as membranas filtrantes propostas nesse trabalho, são aptas para remoção dos micro-organismos em amostras coletadas em duas bacias hidrográficas (Jaboatão e Igarassu). Foi observado que as membranas produzidas foram eficientes na eliminação das bactérias presentes na amostra sem apresentar crescimento microbiológico quando o filtrado foi inoculado. Vale ressaltar, que as amostras coletadas podem conter outras bactérias, não apenas *E. coli*, e os meio de cultura utilizado juntamente com as condições de incubação proporcionam esse crescimento.

Figura 24- Fotografias das placas de Petri inoculadas com amostras da bacia hidrográfica do rio Igarassu antes e após a filtração com membrana de celulose bacteriana modificada (CBSiB3) e membrana comercial.

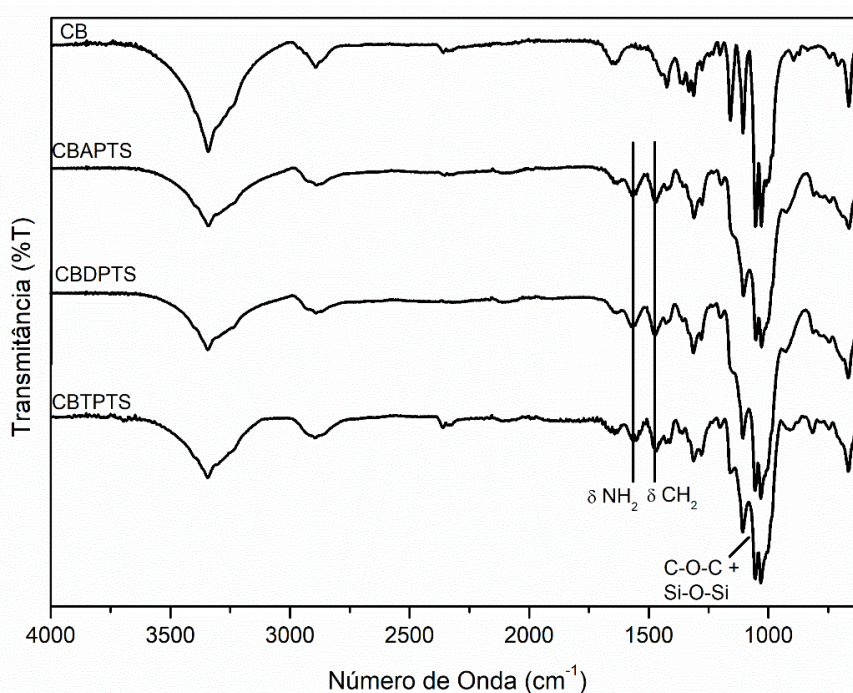


Fonte: A autora (2019)

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CELULOSE MODIFICADAS COM SILILANTES

A Figura 25 mostra o espectro de infravermelho obtido para os compósitos CBAPTS, CBDPTS e CBTPTS. Além dos estiramentos típicos da celulose bacteriana, discutidos anteriormente, pode ser observado, em todos os espectros, novas bandas em 1575 cm^{-1} atribuído a deformação angular de grupos NH_2 de aminas primárias e em 1480 cm^{-1} correspondente a deformação angular de CH_2 (FERNANDES *et al.*, 2013; MOHD *et al.*, 2016; OSMAN; AROF, 2003) confirmando que a CB foi modificada.

Figura 25-Espectro de infravermelho da celulose bacteriana e celulose bacteriana modificada com APTS, DPTS e TPTS.



Fonte: A autora (2019)

Estiramentos referentes a ligações Si-O-C e Si-O-Si dificilmente são identificados em membranas de celulose bacteriana porque se sobrepõe aos estiramentos característicos das ligações glicosídicas que ocorrem entre 1150 e 1135 cm^{-1} presentes na celulose (MENG, *et al.*, 2015). Pode-se observar, portanto, um alargamento das bandas que aparecem nessa região, sugerindo que os estiramentos Si-O-Si e C-O-C estão sobrepostos. Da mesma forma, estiramentos de N-H que

ocorrem entre 3500-3000 cm^{-1} estão sobrepostos aos estiramentos O-H que aparecem na mesma região.

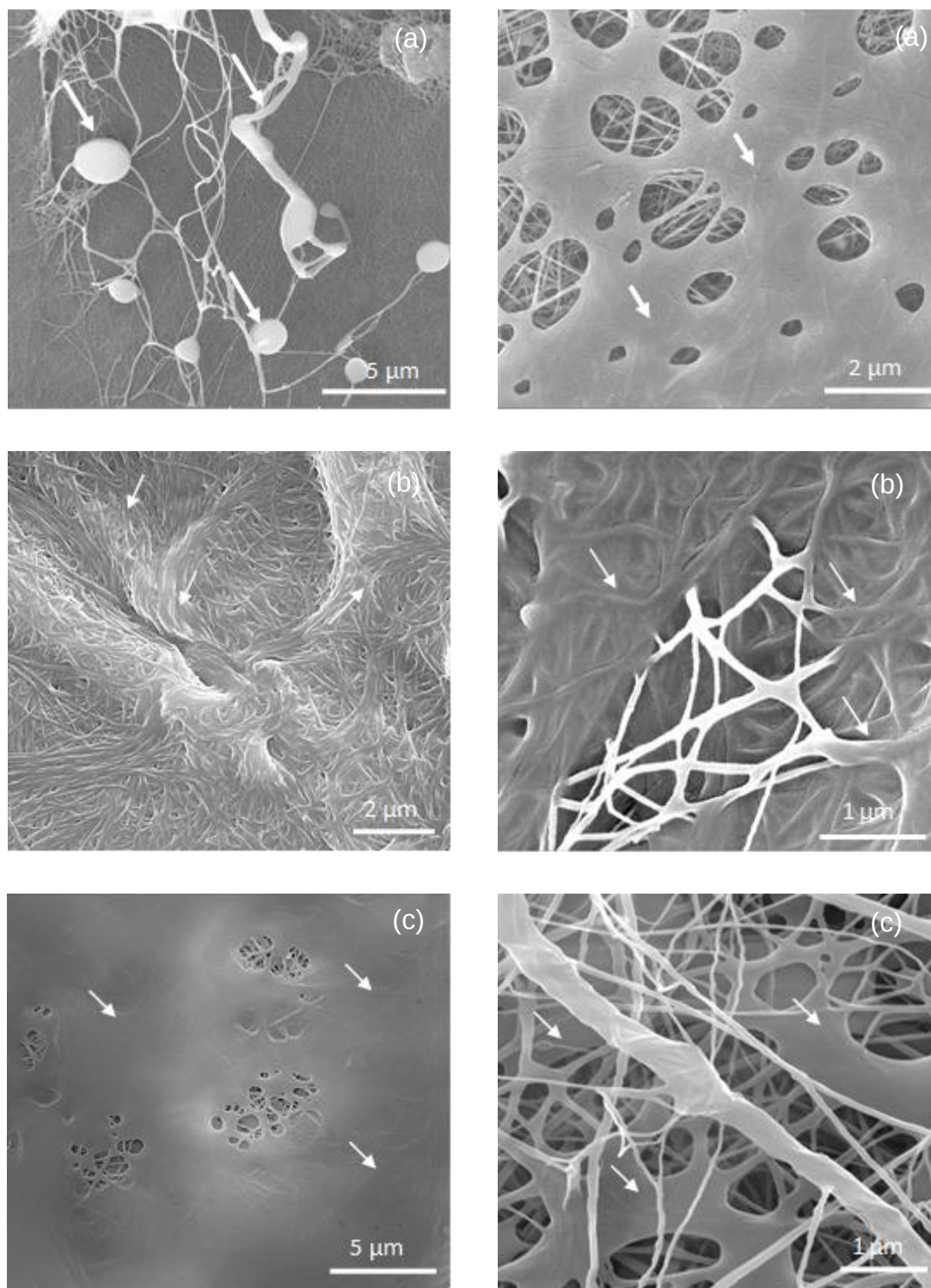
De acordo com Fernandes *et al.* (2013) a funcionalização da celulose inicia com a difusão do sililante na membrana com formação de grupos silanóis derivados das reações de hidrólise (descrita na Figura 17). As espécies hidrolisadas interagem com as hidroxilas presentes na celulose bacteriana formando ligações de hidrogênio, esse processo ocorre concomitantemente às reações de condensação do sililante formando redes inorgânicas funcionalizadas contendo ligações siloxanos.

Os agentes sililantes possuem fórmula geral $(\text{X})_3\text{Si}(\text{R})\text{Y}$, onde X é um grupo alcóxido, R um grupo orgânico denominado de espaçador e Y pode ser Cl, CN, SH NH_2 etc. (AIROLDI, 2007). Os agentes sililantes utilizados nesse trabalho possuem um (APTS), dois (DPTS) ou três (TPTS) grupo amino em sua estrutura. O aumento dos grupos aminos no polímero visa minimizar a lixiviação das nanopartículas de prata produzidas *in situ*, como consequência das interações formadas entre os grupos aminos e as NP_{Ag}.

A morfologia dos nanocompósitos produzidos foi estudada por microscopia eletrônica de varredura de acordo com a Figura 26 (a) (CBAPTS), Figura 26 (b) (CBDPTS) e Figura 26 (c) (CBTPTS). Há uma clara alteração na morfologia da celulose bacteriana após a adição dos sililantes. Para todas as amostras, foi possível observar sílica aderida as nanofibrilas do polímero, indicada nas imagens por uma seta branca, recobrando a superfície da membrana, preenchendo os interstícios entre as fibrilas sem destruí-las. Além da modificação na superfície da CB, foi possível observar na Figura 26 (a), referente a amostra CBAPTS formação de partículas esféricas de sílica aderidas as nanofibrilas com tamanho no intervalo de 1,18 a 3,15 μm .

Pode-se observar ainda que a CB/sililantes forma uma maior distribuição de sílica na superfície do polímero quando comparada a CB/Sílica. Essa diferença na morfologia das amostras pode estar associada ao fato de que a CB/Sililantes forma uma rede de sílica mais ramificada que se difunde mais uniformemente na superfície da CB. Meng *et al.* (2015) e Fernandes *et al.* (2013) modificaram celulose bacteriana com APTS e observaram formação de uma rede inorgânica de sílica na superfície do polímero obtendo resultados semelhantes aos reportados nesse trabalho.

Figura 26-Microscopia eletrônica de varredura da celulose bacteriana modificada com APTS (a) com DPTS (b) e TPTS (c).

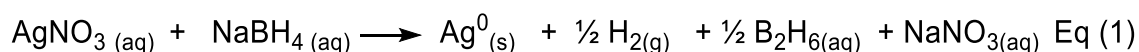


Fonte: A autora (2019)

4.6 CELULOSE BACTERIANA MODIFICADAS COM SILILANTES E NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A produção de nanopartículas de prata *in situ* ocorreu pelo método da redução química, amplamente difundido pela literatura (HE; KUNITAKE; NAKAO, 2003, JUNG *et al.*, 2009, ZHU *et al.*, 2009 e YAN *et al.*, 2016), para formação de compósitos de celulose. Agentes redutores como o citrato de sódio, ácido ascórbico e borohidreto de sódio são frequentemente utilizados na síntese de NPAg (PILLAI e KAMAT, 2004; ZIELINSKA *et al.* 2009; MAVANI E SHAH, 2013) variando a morfologia e o tamanho das nanoestruturas. Nesse trabalho, o NaBH₄ foi utilizado, por ser um forte agente redutor, capaz de reduzir rapidamente íons Ag⁺ a prata metálica e formar nanopartículas muito pequenas que pode chegar até 3 nm de diâmetro (QUIN *et al.*, 2010; SANTOS, *et al.*, 2014).

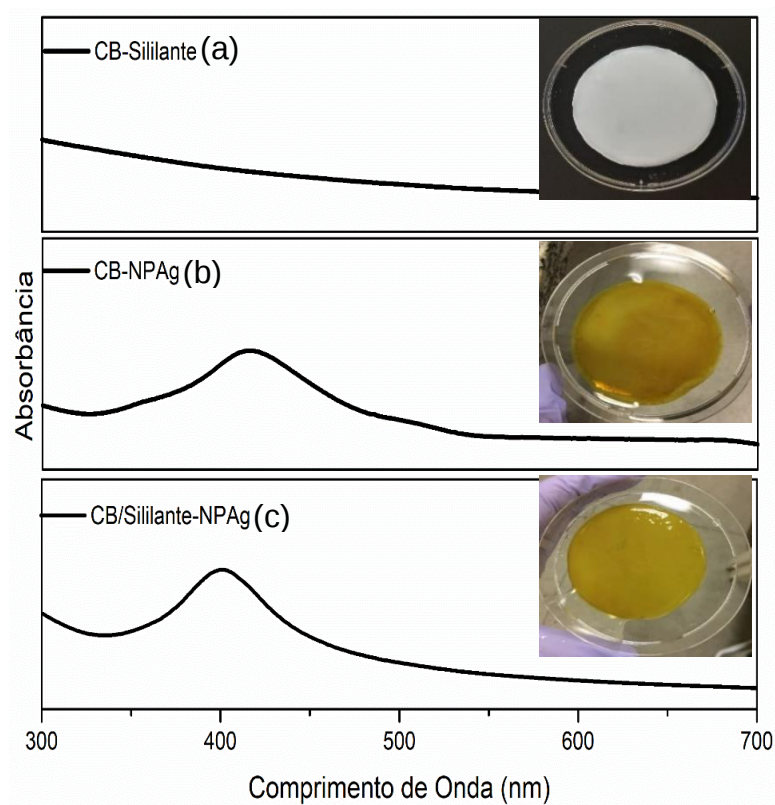
De acordo com He; Kunitake; Nakao (2003), Maria *et al.* (2010) e Maneerung *et al.* (2008) quando CB é mergulhada na solução de nitrato de prata os íons Ag⁺ se difundem na celulose promovendo interações eletrostáticas com átomos de oxigênio das hidroxilas que compõem as nanofibrilas do polímero. Quando as membranas são adicionadas a solução de NaBH₄ os íons Ag⁺ são reduzidos a nanopartículas de prata metálica de acordo com a equação 1.



Após a formação das nanopartículas de prata, as membranas mudaram a sua coloração de branca para amarela como pode ser observado na Figura 28, sugerindo a formação das NPAg *In situ* (YANG *et al.*, 2012; CHOOK *et al.*, 2017). A Figura 27 mostra ainda as medidas de absorção dos compósitos. De acordo com Chook *et al.* (2017) e Solomon *et al.* (2007), nanopartículas de prata esféricas possuem uma coloração amarelo brilhante com uma intensa banda no espectro de absorção em torno de 400 nm. Essa banda resulta do fenômeno conhecido como ressonância de plásmon da superfície (SPR) que ocorre a partir da interação da radiação incidente com os elétrons da banda de condução do metal excitando-os coletivamente (YESHCHENKO *et al.*, 2012; MAVANI *et al.*, 2013).

As membranas modificadas com APTS, DPTS e TPTS contendo NPAg, apresentaram uma banda de absorção com $\lambda_{\text{máx}}$ em 400 nm, enquanto a celulose sem adição do sililantes (CB-Ag) apresentou banda de absorção com máximo em 414 nm.

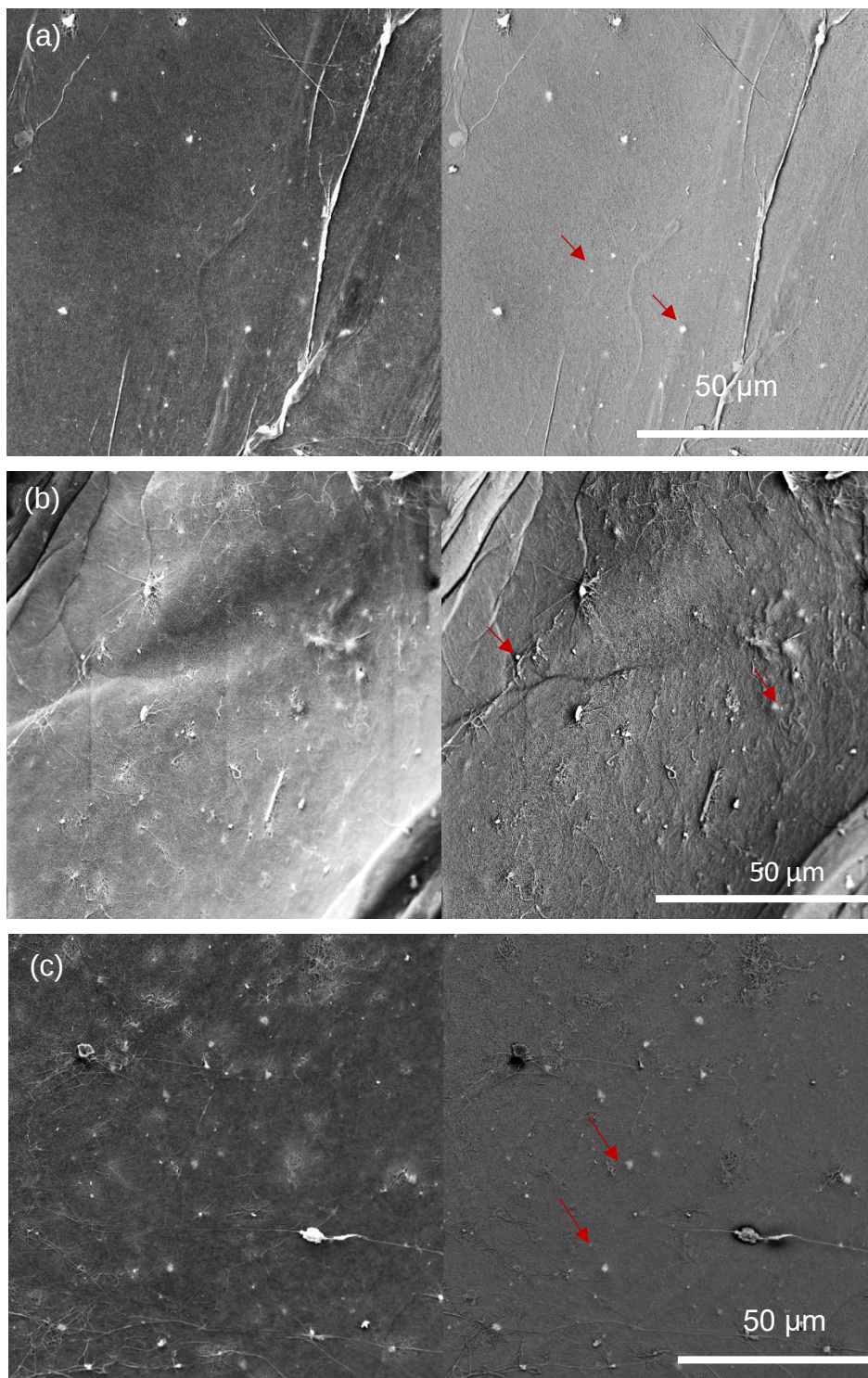
Figura 27-Fotografia e espectros de absorção obtidos para a membranas de celulose modificada com sililantes (a), celulose com NPAg (b), celulose modificada com sililante e nanopartículas de prata (c).

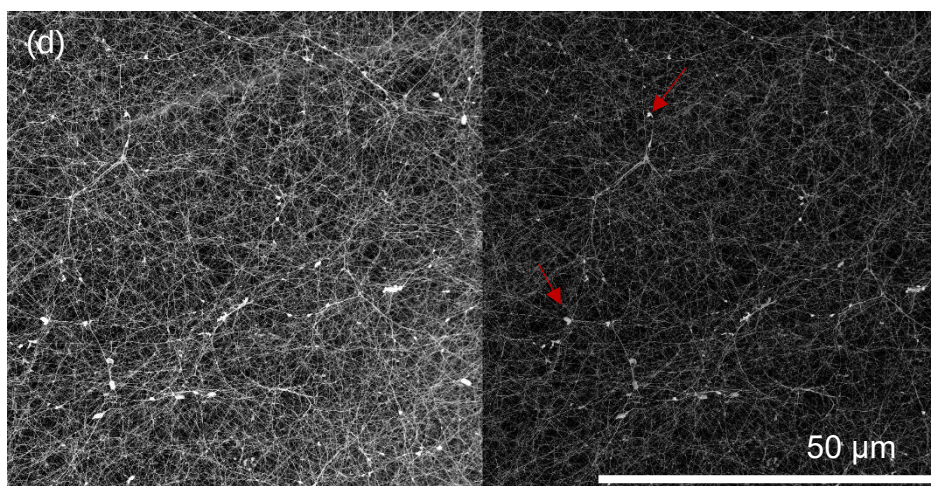


Fonte: A autora (2019)

As microscopias eletrônicas de varredura dos compósitos de celulose bacteriana contendo nanopartículas de prata estão presentes na Figura 29 e 30. Todas as imagens foram obtidas por detectores de elétrons secundários (lado direito) e retroespalhados (lado esquerdo). O contraste atribuído aos elétrons retroespalhados, permite distinguir regiões com diferentes composições, uma vez que o coeficiente de emissão dos elétrons retroespalhados emitidos pela amostra está diretamente relacionado com o número atômico dos elementos presentes (AMELINCKX, *et al.* 1997; EGERTON, 2005). As imagens obtidas por elétrons retroespalhados (Figuras 28 e 29) mostraram diferença de contraste na amostra sendo indicado pela seta vermelha a presença da prata na membrana.

Figura 28-Microscopia eletrônica de varredura CBAPTS-Ag (a), CBDPTS-Ag (b), CBTPTS- Ag (c), CB-Ag (d).

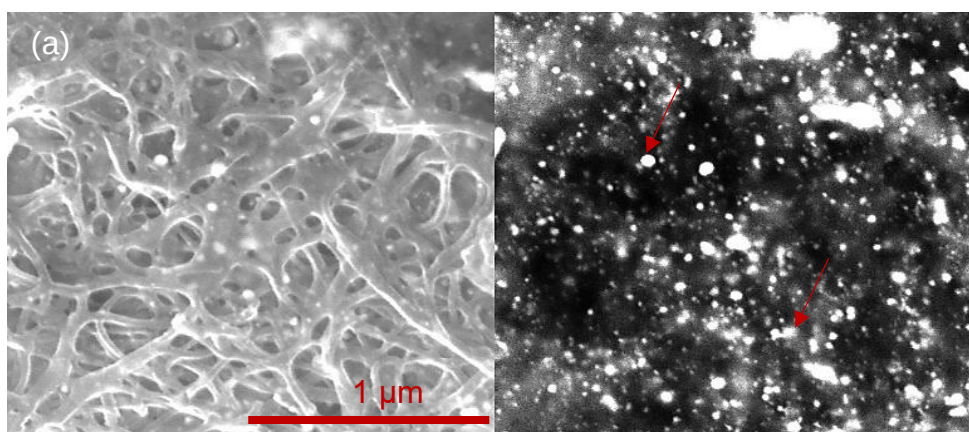


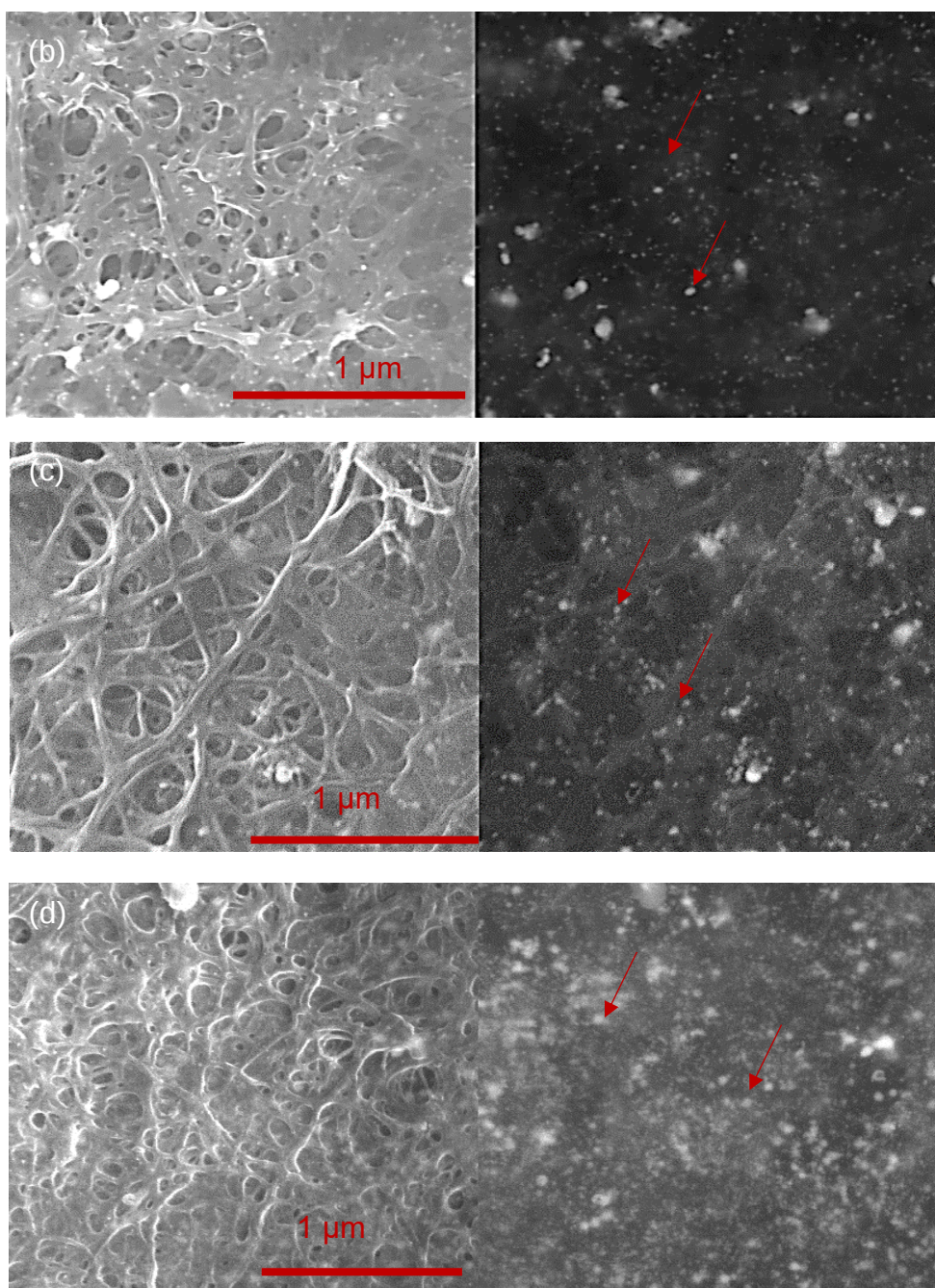


Fonte: A autora (2019)

Quando as imagens foram obtidas com magnificação de 150 mil vezes (Figura 29) o feixe de elétrons primários abriu “buracos” nas amostras, sendo possível analisar as regiões mais internas das membranas. As imagens obtidas por elétrons secundários, ofereceu informações sobre a topografia do espécime mostrando as nanofibrilas, característica da CB, com partículas distribuídas em toda região, enquanto as imagens obtidas por elétrons retroespalhados mostrou pontos brilhantes distribuídos nas fibrilas do polímero indicando a formação de nanopartículas de prata *in situ* como reportado por Maria *et al.*, (2010) e Barud *et al.*, (2011) que impregnaram nanopartículas de prata na celulose bacteriana. De acordo com Yang *et al.*, (2012), a rede tridimensional nanofibrilada da celulose bacteriana atua como *template* favorecendo o crescimento das nanopartículas entre as nanofibrilas do polímero.

Figura 29- Microscopia eletrônica de varredura dos compósitos CBAPTS-Ag (a), CBDPTS-Ag (b), CBTPTS-Ag (c) e CB-Ag (d) obtidas com detector de elétrons secundários (imagens localizadas a esquerda) e elétrons retroespalhados (imagens localizadas a direita).

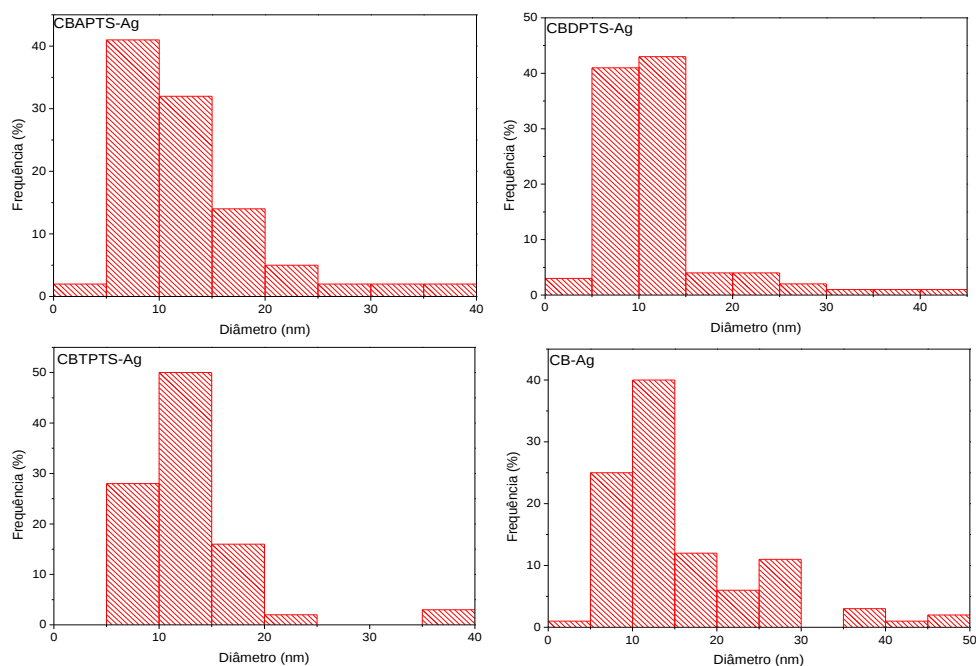




Fonte: A autora (2019)

A Figura 30 mostra os histogramas obtidos das amostras CBAPTS-Ag, CBDPTS-Ag, CB-TPTS-Ag e CB-Ag que apresentaram tamanho médio das partículas de $12,6 \pm 6,9$ nm, $11,4 \pm 6,35$ nm, $13,0 \pm 6,30$ nm, $15,5 \pm 8,9$ nm, respectivamente. O desvio padrão elevado indica que as nanopartículas apresentaram variação de tamanho.

Figura 30- Histogramas das amostras CBAPTS-Ag, CBDPTS-Ag, CBTPTS-Ag e CB-Ag.

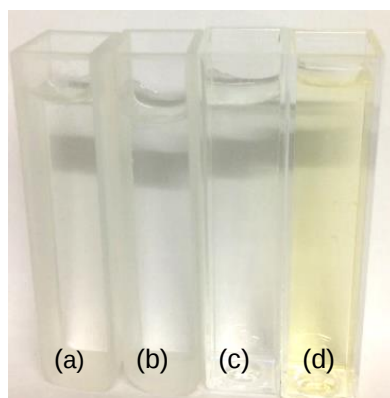


Fonte: A autora (2019)

4.7 TESTE DE LIBERAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A Figura 31 mostra o resultado do teste de liberação da prata para os compósitos (CBAPTS-Ag, CBDPTS-Ag, CBTPTS-Ag e CB-Ag). Pode-se observar que o sobrenadante da celulose com NPAg sem sililante apresentou uma coloração amarela, enquanto os sobrenadantes oriundos da celulose bacteriana modificada com sililantes e nanopartículas de prata permaneceu incolor, indicando lixiviação das nanopartículas por parte da CB-Ag (Yang *et al.*, 2012).

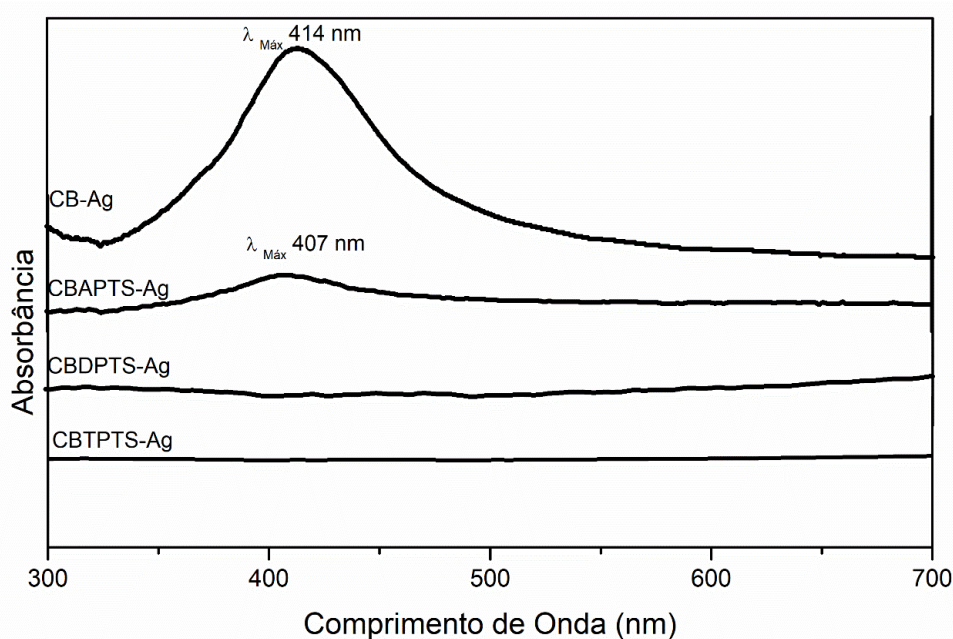
Figura 31- Teste de liberação das NPAg para a celulose bacteriana e compósitos: (a) CBAPTS-Ag, (b) CBDPTS-Ag, (c) CBTPTS-Ag e (d) CB-Ag.



Fonte: A autora (2019)

Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis (Figura 32) foi realizada a fim de confirmar a presença das nanopartículas nos sobrenadantes. Os espectros de absorção dos sobrenadantes da CB-Ag e da CBAPTS-Ag apresentaram uma banda de absorção com $\lambda_{\text{máx}}$ em aproximadamente 400 nm. Enquanto a CBDPTS-Ag e CBTPTS-Ag não apresentaram absorção. Esse resultado indica que as nanopartículas são liberadas mais facilmente pela amostra CB-Ag (que não possui sililantes em sua estrutura) e pela CBAPTS-Ag (que possui um sililante constituído por apenas um grupo amino), demonstrando que quanto mais grupos aminos presentes no compósito menor é a lixiviação das nanopartículas. Isso ocorre porque os grupos aminos atuam como um agente quelante ancorando as nanopartículas de prata (CHOOK *et al.*, 2017; KUO; CHEN, 2003; TAGLIETTI *et al.*, 2014).

Figura 32- Espectros de absorção eletrônica dos sobrenadantes após o teste de liberação da prata para a celulose bacteriana e os compósitos CB-Ag, CBAPTS-Ag, CBDPTS-Ag e CBTPTS-Ag.



Fonte: A autora (2019)

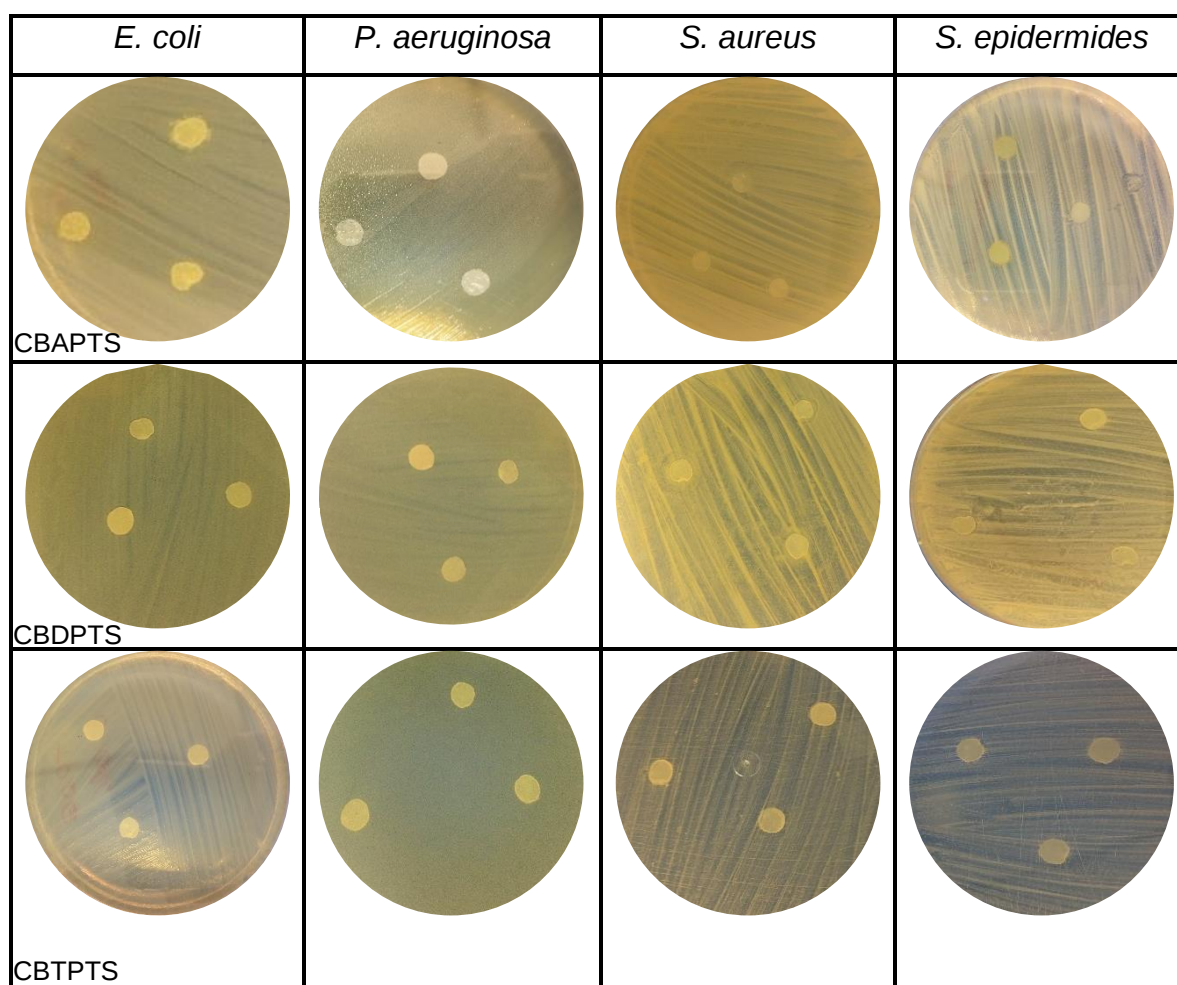
4. 8 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR

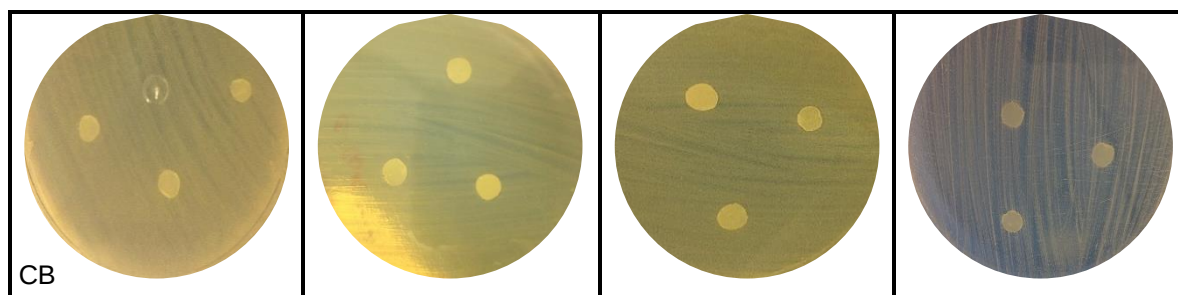
O teste de sensibilidade a antimicrobianos é utilizado frequentemente por laboratórios de microbiologia clínica, com o intuito de fornecer resultados qualitativos quanto a susceptibilidade dos micro-organismos a diferentes antibióticos ou agentes antimicrobianos (SEJAS, *et al.*, 2003). Nesse trabalho, os micro-organismos *S.*

aureus, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. epidermidis* foram utilizados por serem bactérias presentes em infecções epiteliais (SONDRÉ *et al.*, 2015; MANNING, 2018).

Os testes de disco-difusão foram realizados com a celulose bacteriana sem modificação, celulose bacteriana modificada com sililantes e celulose bacteriana após a modificação dos sililantes e adição de NPAg. Os resultados obtidos para a CB, CBAPTS, CBDPTS e CBTPTS, não apresentaram zona de inibição para os micro-organismos testados, como pode ser observado na Figura 33, indicando que o material não possui atividade antimicrobiana para o teste de disco-difusão. O halo de inibição é a denominação dada a zona sem crescimento de micro-organismo, criada ao redor do disco composto pela membrana de celulose modificada e indica a ação antimicrobiana do material frente a determinada bactéria.

Figura 33- Resultado do teste de disco-difusão para a CPAPTS, CBDPTS, CBTPTS e CB frente a *E. coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *S. epidermides*.





Fonte: A autora (2019)

Quando nanopartículas de prata foram adicionadas a celulose bacteriana modificada, halos de inibição foram observados para todos os micro-organismos testados indicando que o material possui atividade antimicrobiana, propriedade desejável para um curativo. A Figura 34 e a Tabela 06 possui as fotografias do teste e os valores dos halos de inibição avaliados, respectivamente.

Atividade antimicrobiana para materiais compostos por celulose bacteriana e nanopartículas de prata já foi reportada pela literatura. Wu *et al.* (2013) realizaram o teste de disco difusão para celulose modificada com nanopartícula de prata a fim de avaliar a ação antimicrobiana da CB para *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Os resultados reportados pelos pesquisadores estão em concordância com os valores dos halos formados para a CB-Ag encontrados nesse trabalho.

Os halos de inibição formados para bactérias gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e bactérias gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosas*) são similares. O pequeno aumento no tamanho dos halos de inibição da celulose modificada com sililantes e NPAg em relação a celulose com NPAg também pode ser identificado, sugerindo que o material produzido possui uma ação antimicrobiana superior a CB-Ag, principalmente para bactérias gram positivas.

Tabela 06-Resultados das medidas dos halos de inibição para a celulose bacteriana modificada com sililantes e nanopartículas de prata.

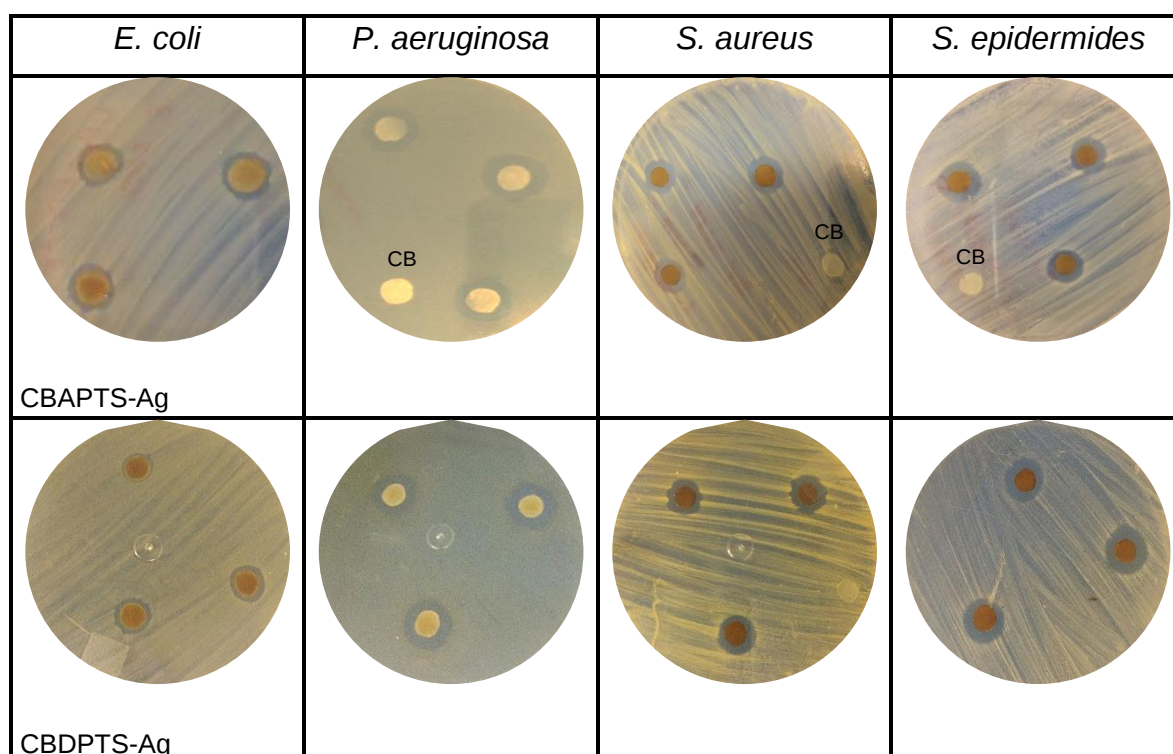
Amostras	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
CB-Ag	8.5 mm	9 mm	8.5 mm	9 mm
CBAPTS-Ag	8.5 mm	11.0 mm	10.0 mm	11.0 mm
CBDPTS-Ag	8.3 mm	12.5 mm	10.0 mm	12.5 mm
CBTPTS-Ag	9.0 mm	9.0 mm	9.5 mm	12.3 mm

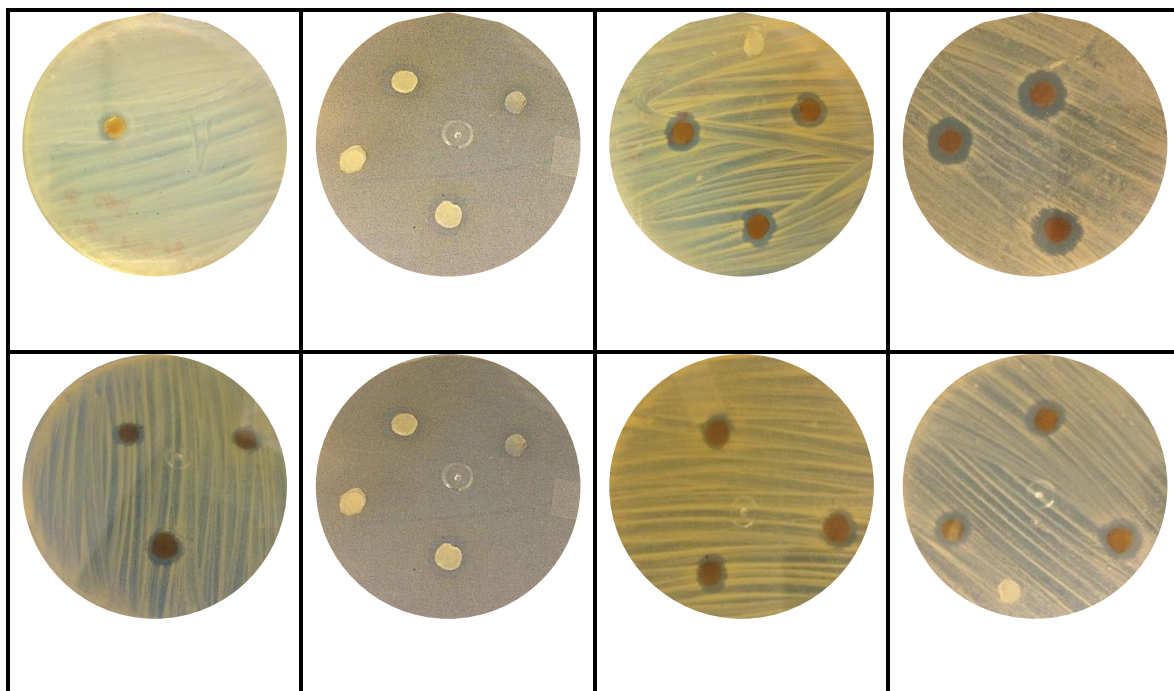
Fonte: A autora (2019)

Estudo de sensibilidade pelo método de disco-difusão para *S. aureus* realizados por Palepou et al. (1998) com mupirocina (antibiótico utilizados no tratamento tópico de feridas) demonstraram zona de inibição equivalentes aos encontrados nesse trabalho. Os pesquisadores reportaram uma relação direta entre o aumento do halo de inibição e a concentração do antibiótico, com halos que variam de 4 a 15 mm para discos contendo 5 µg e 15 µg do antibiótico, respectivamente.

A atividade antimicrobiana da colistina, conhecida também como polimexina E, foi avaliada por Jones et al. (2005). A colistina é um antibiótico utilizado em hospitais para combater infecções causadas por bactérias gram-positivas e negativas. As zonas de inibição reportadas pelos pesquisadores para *P. aeruginosa* estão em concordância com os resultados obtidos para a celulose bacteriana modificada com sililantes e nanopartículas de prata, demonstrando que o material obtido possui ação comparáveis a agentes antimicrobianos reportados na literatura.

Figura 34- Fotografias do resultado do teste de disco-difusão para a CPAPTS-Ag, CBDPTS-Ag e CBTPTS-Ag.





Fonte: A autora (2019)

Os resultados obtidos demonstram que as celulosas bacterianas modificada com sililantes e nanopartículas de prata, possuem uma boa perspectiva na produção de um novo material, que alia as vantagens da celulose bacteriana modificada, com ação antimicrobiana das nanopartículas de prata, possibilitando a sua utilização em tratamentos tópicos, como por exemplo, curativos para feridas crônicas possibilitando a inibição de infecções epiteliais, capaz de atuar também contra bactérias resistentes (YANG *et al.*, 2012), característica das nanopartículas de prata.

5 CONCLUSÕES

- Membranas de celulose bacteriana foram obtidas com eficiência a partir da biossíntese da *Gluconacetobacter xylinus* utilizando glicerol como fonte de carbono;
- Compósitos de CB/sílica (CBSiB1, CBSiB2 e CBSiB3) foram obtidos a partir da reação da CB com o precursor de sílica (TEOS).
- O estudo da capacidade filtrante realizado com a CB e CB/sílica mostrou eficiência na filtração de *Escherichia coli* com concentrações na ordem de 10^8 células/mL. Quando comparadas as membranas comerciais (0,22 μm), os filtros compostos por celulose bacteriana não demonstraram saturação mesmo após a sua reutilização em dez filtrações subsequentes, diferentemente das membranas comerciais que apresentaram saturação após a primeira filtração.
- As membranas produzidas apresentaram grande capacidade filtrante para amostras coletadas em duas bacias hidrográficas (Jaboatão e Igarassu), sendo capazes de descontaminar amostras de grande complexidade microbiológicas oriundas de água de rio que recebe diariamente efluentes de indústrias e residência.
- Os compósitos (CBAPTS, CBDPTS, CBTPTS e CBAPTS-Ag, CBDPTS-Ag e CBTPTS-Ag) foram obtidos a partir da modificação da celulose bacteriana com agentes sililantes e NPAg.
- O teste de liberação das nanopartículas de prata mostrou que a CBDPTS e CBTPTS apresentaram maior capacidade de ancorar as nanopartículas de prata do que a CBAPTS minimizando a liberação descontrolada das nanopartículas.

- Após a inserção das nanopartículas de prata o material produzido apresentou atividade antimicrobiana para bactérias comumente encontradas em infecções epiteliais (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. epidermides*), apresentando-se como um material com potencial para aplicação em curativos.

6 PERSPECTIVAS

- Funcionalizar a sílica depositada nas membranas de celulose com o intuito de realizar filtrações de pesticidas;
- Estudar através de modelo animal a capacidade cicatrizante dos materiais produzidos para aplicação em curativos;
- Realizar um teste quantitativo de inibição do crescimento bacteriano a partir do método de contagem em placa;
- Realizar um estudo de liberação de prata em função do tempo;
- Quantificar a concentração de nanopartículas de prata adicionada as membranas de celulose modificadas;

REFERÊNCIAS

- AELION, R. A.; LOEBEL, F. E. Hydrolysis of Ethyl Silicate. **Journal of American Chemistry Society**, v. 72, p. 5705–5712, 1950.
- AGÊNCIA ESTADUAL DO MEIO AMBEINTE (CPRH, 2016). **Relatório de Monitoramento das Bacias hidrográficas do Estado de Pernambuco**. Disponível em: <http://www.cprh.pe.gov.br/ARQUIVOS_ANEXO/bacias2014/G_Relat16-IG.pdf>. Acesso em 12.10.2018.
- AIROLDI, C.; FARIAS, R. F. Alcóxidos como Precursores na Síntese de Novos Materiais Através do Processo Sol-gel. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 84–88, 2004.
- ALBUQUERQUE, E. R.; ALVES, E. F. Análise da Produção Bibliográfica Sobre Qualidade de Vida de Portadores de Feridas Crônicas. **Revista de Saúde e Pesquisa**. V. 04, n. 02, p. 147-152, 2011.
- ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A Utilização de Materiais Obtidos Pelo Processo de Sol-Gel na Construção de Biossensores. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 835–841, 2002.
- ALMEIDA, I. F. et al. Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 3, p. 332–336, 2014.
- AMELINCKX, S. et al. **Electron Microscopy Principles and Fundamentals**. Primeira edição, editora Wiley, Alemanha, 1997.
- ANGELOVA, T. et al. Antibacterial activity of SiO₂/hydroxypropyl cellulose hybrid materials containing silver nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 5, p. 1241–1246, 2012.
- ANGELOVA, L. V. et al. Cosolvent gel-like materials from partially hydrolyzed poly(vinyl acetate)s and borax. **Langmuir**, v. 27, n. 18, p. 11671–11682, 2011.
- APHA (2012). **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. Editora: American Public Health Association, Washington, 2012.
- ASHORI, A. et al. Bacterial cellulose/silica nanocomposites: Preparation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 413–418, 2012a.
- ASHORI, A. et al. Bacterial cellulose/silica nanocomposites: Preparation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 413–418, 2012b.
- BAKER, R. W. **Reverse osmosis in: Membrane Technology and Applications**.

Segunda edição, editora Wiley, Califórnia, 2004.

BAKER, A. et al. Supra-Molecular Structure and Chemical Reactivity of Cellulose I Studied Using CP / MAS 13 C-NMR. **Progress in Polymer Science**, v. 13, n. 2, p. 451–456, 2002.

BANSOD, S. D. et al. Development of shampoo, soap and ointment formulated by green synthesized silver nanoparticles functionalized with antimicrobial plants oils in veterinary dermatology: treatment and prevention strategies. **IET Nanobiotechnology**. v. 9, p. 165-171, 2015.

BARUD, H. S. et al. Bacterial cellulose-silica organic-inorganic hybrids. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 46, n. 3, p. 363–367, 2008 a.

BARUD, H. S. et al. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, n. 4, p. 515–518, 2008b.

BARUD, H. S. **Novos Materiais Multifuncionais Baseados em Celulose Bacteriana**. Tese e Doutorado (Doutorado em Química). Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2010.

BARUD H. S. et al. Antimicrobial Bacterial Cellulose-Silver Nanoparticles Composite Membranes. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, n. 10, 2011.

BARUD, O. H. G. et al. Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 41–51, 2015.

BARUD, H. G. et al. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 406–420, 2016.

BASTÚS, N.G. et al. Synthesis of Highly Monodisperse Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles of up to 200 nm: Kinetic Control and Catalytic Properties. **Chemistry of Materials**, v. 26, p.2836-2846.

BERGNA, H. E.; ROBERTS, W. O. **Colloidal silica fundamentals and applications**. Primeira Edição, editora Taylor & Francis Group, 884 páginas, Nova York, 2006.

BHAVE, R. R. **Inorganic Membranes Synthesis, Characteristics, and Applications**. Primeira edição, editora Van Nostrand Reinhold, 331 páginas, Nova York, 1991.

BILGI, E. et al. Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean. **International Journal of Biological**

Macromolecules, v. 90, p. 2–10, 2016.

BITTON, G. **Wasterwater Microbiology**. Terceira edição, editora John Wiley & Sons, 765 páginas, Nova Jersey, 2005.

BOIS, L. et al. Functionalized silica for heavy metal ions adsorption. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 221, n. 1–3, p. 221–230, 2003.

BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. **Sol-gel science : the physics and chemistry of sol-gel processing**. Primeira edição, editora Academic Press, 462 páginas, San Diego, 1990.

BROWN, J. On an Acetic Ferment Which Forms Cellulose. **Journal of the Chemical Society**, v. 49, p. 432–439, 1886.

BROWN, R. M. Biosynthesis of cellulose. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 33, p. 1345–1373, 1996.

BROWN, R. M. Cellulose structure and biosynthesis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 5, p. 767–775, 1999.

BUCKLEY, A. M.; GREENBLATT, M. The Sol-Gel Preparation of Silica Gels. **Journal of Chemical Education**, v. 71, n. 7, p. 599–602, 1994.

BUDHIONO, A. et al. Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. **Carbohydrate Polymers**, v. 40, n. 2, p. 137–143, 1999.

BUTCHOSA, N. et al. Nanocomposites of bacterial cellulose nanofibers and chitin nanocrystals: Fabrication, characterization and bactericidal activity. **Green Chemistry**, v. 15, n. 12, p. 3404–3413, 2013.

CACICEDO, M. L. et al. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 172–180, 2016.

CAI, Y. et al. Modified colloidal sol-gel process for fabrication of titania nanofiltration membranes with organic additives. **Journal of Membrane Science**, v. 476, p. 432–441, 2015.

ÇAKAR, F. et al. Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, n. 1, p. 1–13, 2014a.

ÇAKAR, F. et al. Newly developed medium and strategy for bacterial cellulose production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 92, p. 35–40, 2014b.

CANNON, R. E.; ANDERSON, S. M. Biogenesis of bacterial cellulose. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 435–447, 1991.

CARPENTER, A. W.; DE LANNOY, C. F.; WIESNER, M. R. Cellulose nanomaterials in water treatment technologies. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 9, p. 5277–5287, 2015.

CARREIRA, P. et al. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 15, p. 7354–7360, 2011.

CASLAKE, L. F. et al. Disinfection of Contaminated Water by Using Solar Irradiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 1145–1150, 2004.

CASTELLANO, J. J. et al. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. **International Wound Journal**, v. 4, n. 2, p.114-122, 2007.

CASTRO, C. et al. Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1033–1037, 2012.

CATAURO, M. et al. Morphological and thermal characterization of zirconia/hydroxyapatite composites prepared via sol-gel for biomedical applications. **Ceramics International**, v. 45, n. 2, p. 2835–2845, 2019.

CZAJA, W. K. et al. The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2006.

COLTRO, P. S. et al. Role of plastic surgery on the treatment complex wounds. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**. v. 38, n. 06, p. 381-386, 2011.

CHAWLA, P. R. et al. Microbial Cellulose : Fermentative Production and Applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.

CHENG, Q. et al. Facile fabrication of superhydrophilic membranes consisted of fibrous tunicate cellulose nanocrystals for highly efficient oil/water separation. **Journal of Membrane Science**, v. 525, n. November 2016, p. 1–8, 2017.

CHOOK, S. W. et al. Effective immobilization of silver nanoparticles on a regenerated cellulose–chitosan composite membrane and its antibacterial activity. **New Journal of Chemistry**, v.41, p.5061-5065, 2017.

CHUNG, I. S. *et al.* Three systemic argyria cases after ingestion of colloidal silver solution. **International Journal of Dermatology**, v. 49, p. 1175-1177, 2010.

CIRIMINNA, R. et al. The Sol–Gel Route to Advanced Silica-Based Materials and Recent Applications. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 8, p. 6592–6620, 2013.

COLLIVIGNARELLI, M. C. et al. Overview of the main disinfection processes for wastewater and drinking water treatment plants, **Sustainability**, v. 10, n. 1, p. 1–21, 2018.

COZZOLINO, C. A. et al. Microfibrillated cellulose and borax as mechanical, O₂-barrier, and surface-modulating agents of pullulan biocomposite coatings on BOPP, **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 179–187, 2016.

CRIŞAN, M. et al. Sol-gel based alumina powders with catalytic applications. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 1, p. 448–455, 2011.

CZAJA, W. et al. Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145–151, 2006.

DIMITRIEV, Y.; IVANOVA, Y.; IORDANOVA, R. History of Sol-Gel Science and Technology. **Journal of The University of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 40, n. 12, p. 181–192, 2009.

DINKER, M. K.; KULKARNI, P. S. Recent Advances in Silica-Based Materials for the Removal of Hexavalent Chromium: A Review. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 60, n. 9, p. 2521–2540, 2015.

DONATTI, D. A. **Estudo do processo sol-gel para a obtenção de xerogéis e aerogéis monolíticos**. Tese de Livre Docência. Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2003.

DUFRESNE, A. Cellulose nanomaterial reinforced polymer nanocomposites. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 29, p. 1–8, 2017.

EDGAR, K. J. et al. Advances in cellulose ester performance and application. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1605–1688, 2001.

EGERTON, R. F. **Physical Principles of electron microscopy an introduction to TEM, SEM and AEM**. Primeira edição, editora Springer, Canadá, 2005.

ESA, F.; TASIRIN, S. M.; RAHMAN, N. A. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 113–119, 2014.

FENG, Q. L. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver

ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials Research Part B**, v. 15, p. 662-668, 2000.

FERNÁNDEZ, J. G. et al. Development of nitrocellulose membrane filters impregnated with different biosynthesized silver nanoparticles applied to water purification. **Talanta**, v. 146, p. 237–243, 2015.

FERNANDES, S. C. M. et al. Bioinspired antimicrobial and biocompatible bacterial cellulose membranes obtained by surface functionalization with aminoalkyl groups. **Applied Materials & Interfaces**. v. 05, p. 3290-3297, 2013.

FERREIRA, et al. Complex Wounds. **Clinics**. v. 61, n. 06, 2006.

FIGUEIREDO, A. R. P. et al. In situ synthesis of bacterial cellulose/polycaprolactone blends for hot pressing nanocomposite films production. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 400–408, 2015.

FLORES, M. A. P. **Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Prata para Tratamento de Lesões de Cáries**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

FONG, J. WOOD, F. Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review. **International Journal of Nanomedicine**. v. 1, n. 04, p. 441-449, 2006.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair, **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432–1442, 2013.

FRANCO, S.; GAETANO, V.; GIANNI, T. Urbanization and climate change impacts on surface water quality: Enhancing the resilience by reducing impervious surfaces, **Water Research**, v. 144, p. 491–502, 2018.

GAC, W. et al. Nickel catalysts supported on silica microspheres for CO₂ methanation, **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 272, n. May, p. 79–91, 2018.

GAUTAM, S. et al. A review on systematic study of cellulose. **India Journal of Applied and Natural Science**, v. 2, n. 2, p. 330–343, 2010.

GERARDI, M. **Wastewater Bacteria**. Primeira edição, editora John Wiley & Sons, 267 páginas, Pensilvânia, 2006.

GOEL, N.; SINHA, N.; KUMAR, B. Growth and properties of sodium tetraborate decahydrate single crystals. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 4, p. 1632–1636, 2013.

GOMES, F. P. et al. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. **Biomass and Bioenergy**, v. 55, p. 205–211, 2013.

GUO, J.; CATCHMARK, J. M. Surface area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhiskers and cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1026–1037, 2012.

GUO, Q. et al. Comparison of in Situ and ex Situ Methods for Synthesis of Two-Photon Polymerization Polymer Nanocomposites. **Polymers**, v. 6, p. 2037–2050, 2014.

GUZUN, A. S. et al. Plackett-Burman experimental design for bacterial cellulose-silica composites synthesis. **Materials Science and Engineering C**, v. 42, p. 280–288, 2014.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de Separação por Membranas**. Primeira edição, editora e-papers, 181 páginas, Rio de Janeiro, 2006.

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. Cellulose Nanocrystals : Chemistry , Self-Assembly , and Applications. **Chemical Reviews**, v. d, n. 6, p. 3479–3500, 2010.

HAN, J.; LEI, T.; WU, Q. High-water-content mouldable polyvinyl alcohol-borax hydrogels reinforced by well-dispersed cellulose nanoparticles: Dynamic rheological properties and hydrogel formation mechanism. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 1, p. 306–316, 2014.

HE, J. et al. Superelastic and superhydrophobic bacterial cellulose/silica aerogels with hierarchical cellular structure for oil absorption and recovery. **Journal of Hazardous Materials**, v. 346, p. 199–207, 2018.

HE, J.; KUNITAKE, T.; NAKAO, A. Facile In Situ Synthesis of Noble Metal Nanoparticles in Porous Cellulose Fibers. **Chemistry of Materials**. v. 15, p. 4401–4406, 2003.

HENRIQUE, D. M. et al. Controle de infecção no centro de tratamento de queimados: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Queimadura**, v. 12, n. 4, p. 230–234.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemical Journal**, v. 58, n. 2, p. 345–352, 1954.

HIRAI, A.; TSUJI, M.; HORII, F. TEM study of band-like cellulose assemblies produced by *Acetobacter xylinum* at 4 °C. **Cellulose**, v. 9, n. 2, p. 105–113, 2002.

HOU, L. et al. Pore size effect of mesoporous silica stationary phase on the separation performance of microfabricated gas chromatography columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1552, p. 73–78, 2018.

HU, W. et al. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites, **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 1043–1060, 2014.

HYDE, E. D. E. R. et al. Colloidal Silica Particle Synthesis and Future Industrial Manufacturing Pathways: A Review. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 55, n. 33, p. 8891–8913, 2016.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts, **Journal of Materials Science**, v. 35, n. 2, p. 261–270, 2000.

JONES, R. N. *et al.* Quality Control Guidelines for Testing Gram-Negative Control Strains with Polymyxin B and Colistin (Polymyxin E) by Standardized Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 925-927, 2005.

JONAS, R.; FARAH, L. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1, p. 101–106, 1998.

JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. A. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: Preparação e algumas aplicações, **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 281–288, 2005.

JUNG, R. et al. Antimicrobial Properties of Hydrated Cellulose Membranes with Silver Nanoparticles. **Journal of Biomaterials Science**, v. 20, p. 311-324, 2009.

KAMOUN, E. A.; KENAWY, E. R. S.; CHEN, X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. **Journal of Advanced research**. v. 08, p. 217-233, 2017.

KAYA, S.; CRESSWELL, M.; BOCCACCINI, A. R. Mesoporous silica-based bioactive glasses for antibiotic-free antibacterial applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 83, n. May 2017, p. 99–107, 2018.

KESHK, S. M. A. S.; SAMESHIMA, K. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 478–482, 2005.

KIM, J. et al. Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/Chitosan composite for potential biomedical application. **Journal of Polymer Research**, v. 18, n. 4, p. 739–744, 2011.

KINGKAEW, J. et al. Effect of molecular weight of chitosan on antimicrobial properties

and tissue compatibility of chitosan-impregnated bacterial cellulose films. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 3, p. 534–544, 2014.

KLEMM, D. et al. Bacterial synthesized cellulose - Artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1561–1603, 2001.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

KLEMM, D. et al. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. **Advances in Polymer Science**, v. 205, n. 1, p. 49–96, 2006.

KUO, P. L.; CHEN, W. F. Formation of Silver Nanoparticles under Structured Amino Groups in Pseudo-dendritic Poly(allylamine) Derivatives. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, p. 11267–11272, 2003).

KUROSUMI, A. et al. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 333–335, 2009.

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

KWON, B. H. et al. A Case of Argyria Following Colloidal Silver Ingestion. **Annals of Dermatology**, v. 21, n. 3, 308–310, 2009.

LACASTRE, A.; LOBO, M.; JOÃO, A. Argyria-case report. **Revista brasileira de dermatologia**, v. 88, n. 3, p. 413–416.

LANDÉN, N. X.; LI, D.; STAHL, M. Transition from Inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 20, p. 3861–3885.

LEE, A.; ELAM, J. W.; DARLING, S. B. Membrane materials for water purification: Design, development, and application. **Environmental Science: Water Research and Technology**, v. 2, n. 1, p. 17–42, 2016.

LI, Y. et al. Evaluation of the Effect of the Structure of Bacterial Cellulose on Full Thickness Skin Wound Repair on a Microfluidic Chip. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 3, p. 780–789, 2015.

LIN, N.; DUFRESNE, A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. **European Polymer Journal**, v. 59, n. July, p. 302–325, 2014.

LIN, W. C. et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 603–611, 2013.

LIU, X. et al. Soy protein isolate/bacterial cellulose composite membranes for high efficiency particulate air filtration. **Composites Science and Technology**, v. 138, p. 124–133, 2017.

LOPES, R. **Funcionalização da celulose Bacteriana com peptídeo RGD para Reparação Tecidual da Pele**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual Paulista, São paulo, 2015.

LU, B. et al. One-Pot Assembly of Microfibrillated Cellulose Reinforced PVA-Borax Hydrogels with Self-Healing and pH-Responsive Properties. **Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 1, p. 948–956, 2017.

MCNAMARA, J. T.; MORGAN, J. L. W.; ZIMMER, J. A Molecular Description of Cellulose Biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, n. 1, p. 895–921, 2015.

MADAENI, S. S. The application of membrane technology for water disinfection. **Water Research**, v. 33, n. 2, p. 301–308, 1999.

MAEDA, H. et al. Bacterial Cellulose/silica hybrid fabricated by mimicking biocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 41, p. 5646–5656, 2006.

MANNING, J. Sepsis in the burn Patient. **Critical Care Nursing Clinics of North America**. v. 30, p. 423-430, 2018.

MAVANI, K.; SHAH, M. Synthesis of Silver Nanoparticles by using Sodium Borohydride as a Reducing Agent. **International Journal of Engineering Research & Technology**, v. 2, p. 1-5, 2013.

MARIA, L. C. S. et al. Synthesis and characterization of silver nanoparticles impregnated into bacterial cellulose, **Materials Letters**. v. 63, p. 797-799, 2009.

MARIA, L.C. S. et al. Preparation and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Impregnated in Bacterial Cellulose, **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 20, n. 01, p. 72-77, 2010.

MASAOKA, S.; OHE, T.; SAKOTA, N. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 1, p. 18–22, 1993.

MATSUURA, T. Progress in membrane science and Technology for seawater desalination-a review. **Desalination**, v. 134, n. November 2000, p. 47–54, 2017.

MEBERT, A. M. et al. Nanoengineered silica: Properties, applications and toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 753–770, 2017.

MELLO, L. R. et al. Duraplasty with biosynthetic cellulose: an experimental study. **Journal of Neurosurgery**, v. 86, n. 1, p. 143–150, 1997.

MENKE et al. Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing. **Gynecologic Oncology**. v. 111, 87-91, 2008.

MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, n. 1, p. 132–141, 2014.

MOHMOOD, I. et al. Nanoscale materials and their use in water contaminants removal-a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 3, p. 1239–1260, 2013.

MOSER et al. Evolução dos curativos de prata no tratamento de queimaduras de espessura parcial. **Revista Brasileira e Queimaduras**. v. 12, p. 60-67, 2013.

MOURA, M.R.; MATTOSO, L. H. C.; ZUCOLOTTI, V. Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 520-524, 2019.

MORGAN, J. L. W.; MCNAMARA, J. T.; ZIMMER, J. Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 21, n. 5, p. 489–496, 2014.

MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, p. 2346-2553, 2005.

MUNGER, M. A. et al. Deering-Rice. In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, p. 1–9, 2014.

NAPAVICHAYANUN, S. et al. Interaction and effectiveness of antimicrobials along with healing-promoting agents in a novel biocellulose wound dressing. **Materials Science and Engineering C**, v. 55, p. 95–104, 2015.

NORONHA, V. T. et al. Silver nanoparticles in dentistry. **Dental Materials**. v. 33, n. 10, p.1110-1126, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Drinking-water. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>. (Acesso em 08 Novembro de 2018).

OSMAN, Z.; AROF, A. K. FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. *Electrochimica Acta*, v. 48, p. 993-999, 2003.

PALEPOU, M. F. I. et al. Evaluation of disc diffusion and Etest for determining the susceptibility of *Staphylococcus aureus* to muripicin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 577-583, 1998.

PANDEY, P. K. et al. Contamination of water resources by pathogenic bacteria. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 1–16, 2014.

PARK, S. et al. In situ hybridization of carbon nanotubes with bacterial cellulose for three-dimensional hybrid bioscaffolds. **Biomaterials**, v. 58, p. 93–102, 2015.

PAYMENT, P.; PLANTE, R.; CEJKA, P. Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, oocysts at a large wastewater primary treatment facility. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 188–193, 2001.

PRABHU, S.; POULOSE, E. K. Silver Nanoparticles: Mechanism of Antimicrobial Action, Synthesis, Medical , Applications, and Toxicity Effects. **International Nano Letters**. v. 2, n. 32, p.1-10, 2012.

PECORARO, É. et al. Bacterial cellulose from glucanacetobacter xylinus: Preparation, properties and applications. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**, p. 369–383, 2008.

PENDERGAST, M. M.; HOEK, E. M. V. A review of water treatment membrane nanotechnologies. **Energy and Environmental Science**, v. 4, n. 6, p. 1946–1971, 2011.

PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1277–1286, 2011.

PHAN, T. N. T.; BACQUET, M.; MORCELLET, M. The removal of organic pollutants from water using new silica-supported β -cyclodextrin derivatives. **Reactive and Functional Polymers**, v. 52, n. 3, p. 117–125, 2002.

PHISALAPHONG, M.; JATUPAIBOON, N. Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose-chitosan film. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 482–488,

2008.

PILLAI, Z. S.; KAMAT, P. V. What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method? **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, p. 945-951, 2004.

PINTO, R. J. B. et al. Antibacterial activity of nanocomposites of silver and bacterial or vegetable cellulosic fibers. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 2279-2289, 2009.

PRADO, A. G. S.; FARIA, E. A.; PADILHA, P. M. Aplicação e modificação química da sílica gel obtida de areia. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 544–547, 2005.

QUINTANILLA, D. Q.; SÁNCHEZ, A.; SIERRA, I. Preparation of hybrid organic-inorganic mesoporous silicas applied to mercury removal from aqueous media: Influence of the synthesis route on adsorption capacity and efficiency. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 472, p. 126–134, 2016.

QUIN, Y. et al. Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 372, p. 172-176, 2010.

QIU, Y. et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-vaccarin membranes for wound healing. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 303–309, 2016.

QU, Q. et al. Rods-on-sphere silica particles for high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1497, p. 87–91, 2017.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 72, p. 76-83, 2009.

REIS, E. M. **Síntese e caracterização de híbridos porosos à base de sílica e quitosana obtidos através do processo sol-gel para aplicação em engenharia de tecidos**. Tese (Doutorado em Engenharia metalúrgica e de minas), Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2007.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological reviews**, v. 55, n. 1, p. 35–58, 1991.

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 613–622, 2012.

SAI, H. et al. Surface modification of bacterial cellulose aerogels' web-like skeleton for oil/water separation. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 13, p. 7373–

7381, 2015.

SANTOS, V. E. et al. A New “Silver-Bullet” to treat caries in children – Nano Silver Fluoride: A randomised clinical trial. **Journal of Dentistry**, v. 42, p. 945-951.

SASKA, S. et al. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. **International Journal of Biomaterials**, v. 2011, 2011.

SCHWARZENBACH, R., P. et al. The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1072–1077, 2006.

SEGAL, L. et al. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786–794, 1959.

SEJAS, L. M. et al. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 27-35, 2003.

SETYAWATI, M. I.; CHIEN, L. J.; LEE, C. K. Self-immobilized recombinant *Acetobacter xylinum* for biotransformation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 1, p. 78–84, 2009.

SHAH, J.; BROWN, R. M. Towards electronic paper displays made from microbial cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 352–355, 2005.

SHAH, N. et al. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1585–1598, 2013.

SHAO, W. et al. Novel bioactive surface functionalization of bacterial cellulose membrane. **Carbohydrate Polymers**, v.178, p.270-276, 2017.

SHEYKHNAZARI, S. et al. Bacterial synthesized cellulose nanofibers; Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1187–1191, 2011.

SHEYKHNAZARI, S. et al. Bacterial cellulose composites loaded with SiO₂nanoparticles: Dynamic-mechanical and thermal properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 672–677, 2016.

SHI, M. et al. Superhydrophobic silica aerogels reinforced with polyacrylonitrile fibers for adsorbing oil from water and oil mixtures. **RSC Advances**, v. 7, n. 7, p. 4039–4045, 2017.

SHI, Z. et al. Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 539–545, 2014.

SILVA, N. et al. **Microbiological Examination Methods of Food and Water**. Primeira edição, editora Taylor e Francis Group, 469 páginas, Londres, 2013.

SILVA, N. H. C. S. et al. Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: In vitro dissolution and permeation studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, n. 1, p. 264–269, 2014.

SINGH, L. P. et al. Sol-Gel processing of silica nanoparticles and their applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 214, p. 17–37, 2014.

SODRÉ, C. N. S. et al. Perfil de infecção em pacientes vítimas de queimadura no Hospital Federal do Andaraí. **Revista Brasileira de Queimaduras**. v. 14, p. 109-112, 2015.

SOLOMON, S. D. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. **Journal of Chemical Education**. v.84, p. 322-325, 2007.

SONDI, I.; SONDI, B. S. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria, **Journal of colloid and Interface Science**. v. 275, p. 177-182, 2004.

SPOLJARIC, S. et al. Stable, self-healing hydrogels from nanofibrillated cellulose, poly(vinyl alcohol) and borax via reversible crosslinking. **European Polymer Journal**, v. 56, n. 1, p. 105–117, 2014.

STUMPF, T. R. et al. In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 82, p. 372–383, 2018.

SULAEVA, I. et al. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1547–1571, 2015.

SURATAGO, T. et al. Development of bacterial cellulose/alginate nanocomposite membrane for separation of ethanol-water mixtures. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 32, p. 305–312, 2015.

TAHA, A. A. et al. Preparation and application of functionalized cellulose acetate/silica composite nanofibrous membrane via electrospinning for Cr(VI) ion removal from aqueous solution. **Journal of Environmental Management**, v. 112, p. 10–16, 2012.

TAHERGORABI, M. et al. Application of thiol-functionalized mesoporous silica-coated magnetite nanoparticles for the adsorption of heavy metals. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 42, p. 19834–19845, 2016.

TAGLIETTI, A. et al. Antibiofilm activity of a monolayer of silver nanoparticles anchored to an amino-silanized glass surface. **Biomaterials**, v. 35, p. 1779-1788, 2014.

TAKAI, F. NONOMURA, T. INUKAI, M. FUJIWARA, AND J. H. Filtration and Permeation Characteristics of Bacterial Cellulose Composites. **Transaction**, v. 47, n. 3, p. 53–63, 1991.

RAVANCHI, M. T.; KAGHAZCHI, T.; KARGARI, A. Application of membrane separation processes in petrochemical industry: a review. **Desalination**, v. 235, n. 1–3, p. 199–244, 2009.

TARJINO, A. G. R. et al. An innovative approach to treating dental decay in children. A new anti-caries agent. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, p. 2041-2047, 2014.

TAZIMA, M. F.; ANDRADE, V. Y.; MORIYA, T. Biologia da Ferida e Cicatrização. **Medicina (Ribeirão Preto on line)**. v. 41, n. 03, p. 259-264, 2008.

TOMÉ, L. C. et al. Preparation and characterization of bacterial cellulose membranes with tailored surface and barrier properties. **Cellulose**, v. 17, n. 6, p. 1203–1211, 2010.

TORGBO, S.; SUKYAI, P. **Bacterial cellulose-based scaffold materials for bone tissue engineering** *Applied Materials Today*, 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10^a Edição, editora artmed, Porto Alegre, 2012.

TRAVAN, A. et al. Non-cytotoxic Silver Nanoparticle-Polysaccharide Nanocomposites with Antimicrobial Activity. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 1429-1435, 2009.

TSALAGKAS, D. et al. Fabrication of bacterial cellulose thin films self-assembled from sonochemically prepared nanofibrils and its characterization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 28, p. 136–143, 2016.

ULBRICHT, M. Advanced functional polymer membranes. **Polymer**, v. 47, n. 7, p. 2217–2262, 2006.

UMMARTYOTIN, S. et al. Development of transparent bacterial cellulose nanocomposite film as substrate for flexible organic light emitting diode (OLED)

display. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 92–97, 2012.

VANSANT, E. F.; VOORT, P. V. D.; VRANCKEN, K. C. **Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface**. 1 st ed. Amsterdam: Elsevier, 1995.

VIEIRA, C. P. D.; ARAÚJO, T. M. E. Prevalência e Fatores Associados a Feridas Crônicas em Idosos na Atenção Básica. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**. v. 52, p.1-8, 2018.

VINCENT, A. et al. Role of catalyst on refractive index tunability of porous silica antireflective coatings by sol-gel technique. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 23, p. 8291–8298, 2007.

VITTA, S.; THIRUVENGADAM, V. Multifunctional bacterial cellulose and nanoparticle-embedded composites. **Current Science**, v. 102, n. 10, p. 1398–1405, 2012.

XUE, C. H. et al. Superhydrophobic conductive textiles with antibacterial property by coating fibers with silver nanoparticles. **Applied Surface Science**. v. 258, p. 2468-2472.

ZAINI, M. A. A.; AMANO, Y.; MACHIDA, M. Adsorption of heavy metals onto activated carbons derived from polyacrylonitrile fiber. **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, n. 1–3, p. 552–560, 2010.

ZEMNUKHOVA, L.; KHARCHENKO, U.; BELENEVA, I. Biomass derived silica containing products for removal of microorganisms from water. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 5, p. 1495–1502, 2015.

ZHAO, H. et al. Surfactant-templated mesoporous silicate materials as sorbents for organic pollutants in water. **Environmental Science and Technology**, v. 34, n. 22, p. 4822–4827, 2000.

ZHONG, C. et al. Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. **Biotechnological products and process engineering**, v. 97, p.6189- 6199, 2013.

ZHU, C.; XUE, J.; HE, J. Controlled In-Situ Synthesis of Silver Nanoparticles in Natural Cellulose Fibers Toward Highly Efficient Antimicrobial Materials. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v. 09, p. 3067-3074, 2009.

ZHURAVLEV L. T. The Surface Chemistry of Amorphous Silica. Zhuralev Model. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 173, p. 1–38, 2000.

ZIELINSKA, A. et al. Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size. **Procedia Chemistry**. v. 1, p. 1560-1566, 2009.

YAMADA Y.; HOSHINO, K., I.; ISHIKAWA, T. The Phylogeny of Acetic Acid Bacteria Based on the Partial Sequences of 16S Ribosomal RNA: The Elevation of the Subgenus *Gluconoacetobacter* to the Generic Level. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 8, p. 1244–1251, 1997.

YAN, J. et al. Antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized In-situ by solution spraying onto cellulose. **Carbohydrate Polymers**. v. 147, p. 500-508, 2016.

YANG, G. et al., Antimicrobial activity of silver nanoparticle impregnated bacterial cellulose membrane: Effect of fermentation carbon sources of bacterial cellulose. **Carbohydrates Polymers**, v. 87, p. 839-845, 2012.

YESHCHENKO, O. A. et al. Size and Temperature Effects on the Surface Plasmon Resonance in Silver Nanoparticles. **Plasmonics**. v. 7, p. 685-694, 2012.

YIN, N. et al. Porous bacterial cellulose prepared by a facile surfactant-assisted foaming method in azodicarbonamide-NaOH aqueous solution. **Materials Letters**, v. 81, p. 131–134, 2012.

WANG, J.; ZHU, Y.; DU, J. Bacterial Cellulose: a Natural Nanomaterial for Biomedical Applications. **Journal of Mechanics in Medicine and Biology**, v. 11, n. 02, p. 285–306, 2011.

WANG, Y. et al. Fabrication of nanofibrous microcarriers mimicking extracellular matrix for functional microtissue formation and cartilage regeneration. **Biomaterials**, v. 171, p. 118–132, 2018.

WANICHAPICHART, P. et al. Characterization of cellulose membranes produced by *Acetobacter xylinum*. **Journal of Science and Technology**, v. 24, p. 855–862, 2002.

WERTZ, J. L.; BÉDUÉ, O.; MERCIER, J. P. **Cellulose Science and Technology**. Primeira edição, editora EPFL press, 370 páginas, Lausana, 2010.

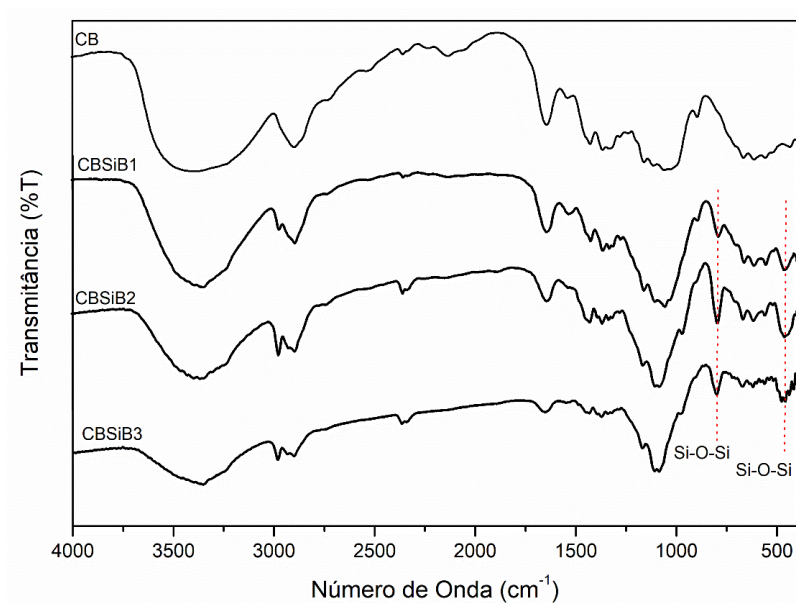
WICHAI, S. et al. Development of bacterial cellulose/alginate/chitosan composites incorporating copper (II) sulfate as an antibacterial wound dressing. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v. 51, p. 662-671.

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

WUSTENBERG, T. **Cellulose and Cellulose Derivatives in the Food Industry Fundamentals and Applications**. Primeira edição, Editora Wiley-VCH, Alemanha, 2015.

APÊNDICE A- ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA CBSiB1, CBSiB2 E CBSiB3

Figura 35-Espectro de infravermelho da membrana de celulose bacteriana (CB), celulose bacteriana modificada com sílica (CBSiB1, CBSiB2 e CBSiB3).



APÊNDICE B- CONJUNTO DE FILTRAÇÕES DA CELULOSE BACTERIANA MODIFICADA (CBSiB1, CBSiB2 E CBSiB3)

Figura 36- Resultado das filtrações de suspensões concentradas de *E. coli* realizadas com membrana comercial e membrana de celulose modificada (CBSiB1).

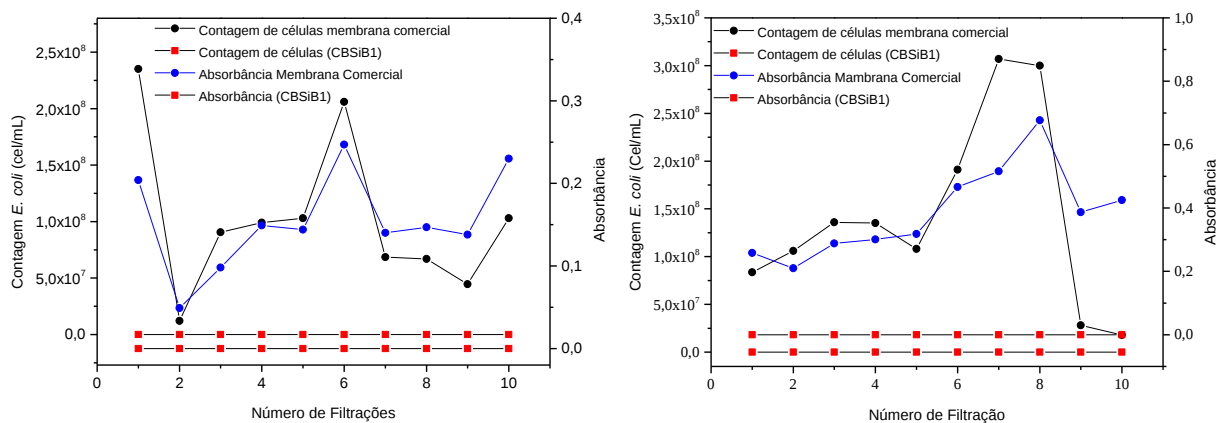


Figura 37- Resultado das filtrações de suspensões concentradas de *E. coli* realizadas com membrana comercial e membrana de celulose modificada (CBSiB2).

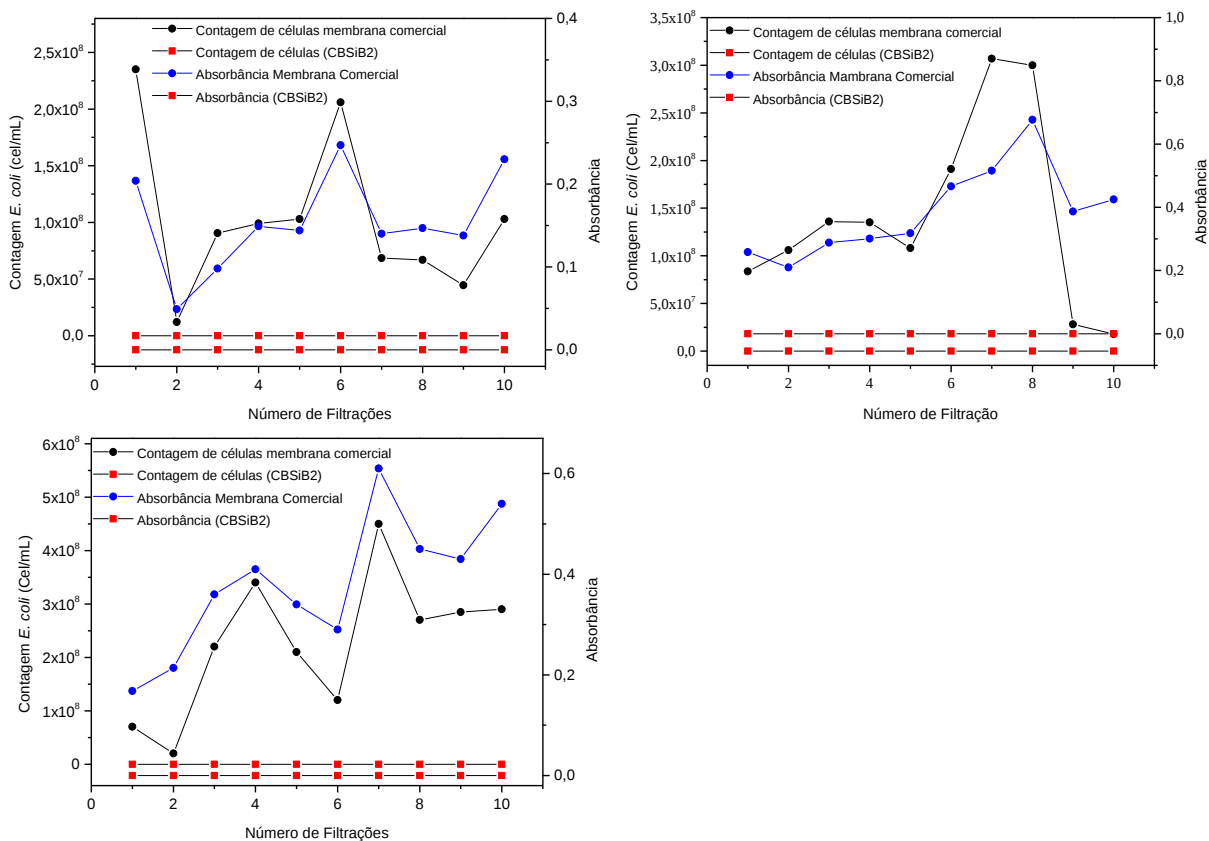
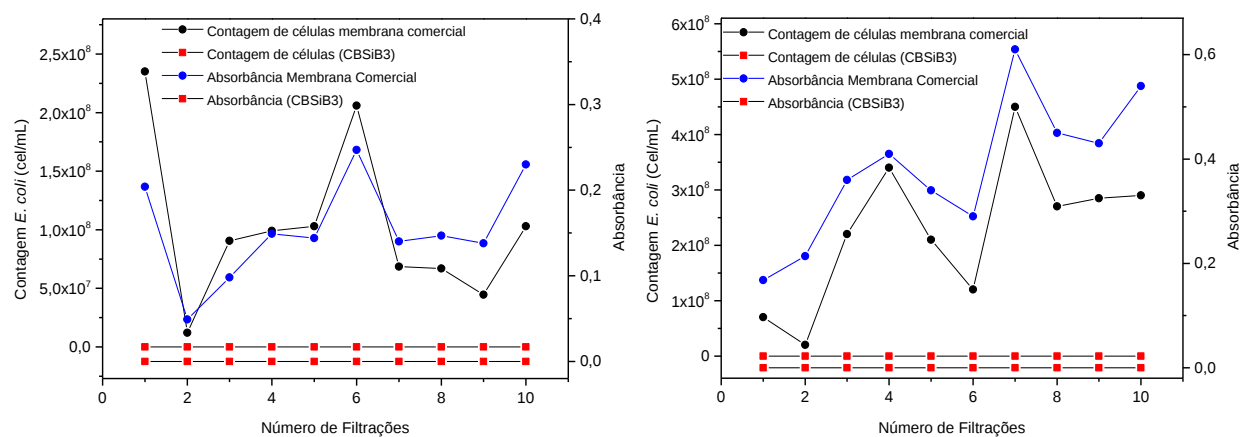
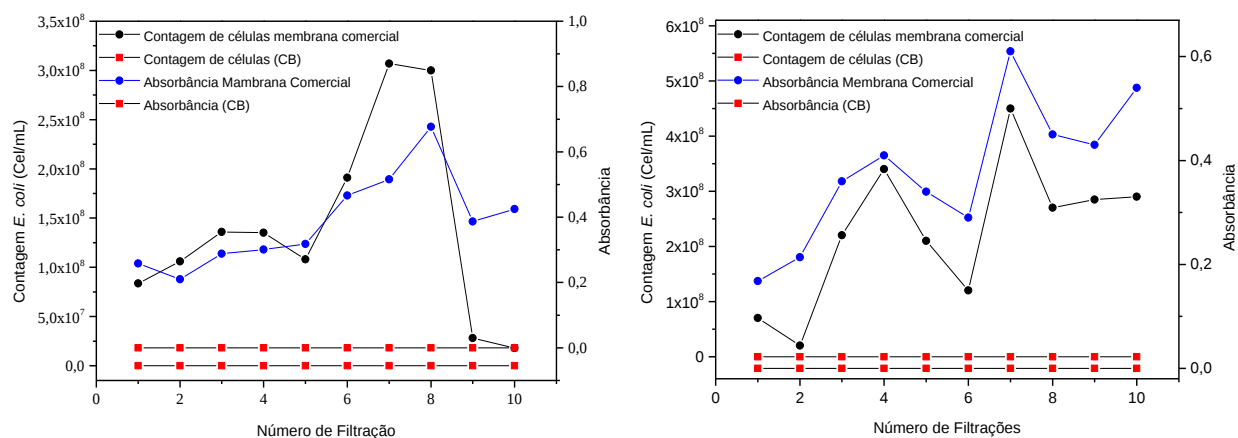


Figura 38- Resultado das filtrações de suspensões concentradas de *E. coli* realizadas com membrana comercial e membrana de celulose modificada (CBSiB3).



APÊNDICE C- CONJUNTO DE FILTRAÇÕES DA CELULOSE BACTERIANA

Figura 39-Gráfico com o resultado das filtrações de suspensões concentradas de *E. coli* realizadas com membrana comercial e membrana de celulose bacteriana (CB).



ANEXO A- LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA REDE DE MONITORAMENTO DO RIO JABOATÃO

Tabela 07- Estações de amostragem da rede de monitoramento do rio Jaboatão Localização

Zona Homogênea	Amostra	Corpo d'água	Coordenadas Geográficas*
Urbana/Industrial	10	Rio Jaboatão	-8,1205 -35,08856111
Estuarina	75	Rio Jaboatão	-8,229072222 -34,97285
Proteção de Manancial	05	Rio Jaboatão	-8,138927778 -35,20038889
Proteção de Manancial	25	Rio Duas Unas	-8,087986111 -35,10045833

Fonte: (CPRH, 2016) *Datum de referência Cartográfica: SAD 69. Fonte: (CPRH, 2016).

ANEXO B- DIAGRAMA UNIFILAR CONTENDO OS PONTOS DE COLETA DO RIO JABOATÃO E DESCRIÇÃO DAS ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM

Figura 40- Diagrama Unifilar contendo os pontos de amostragem da bacia hidrográfica de Jaboatão.

