

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

Caroline Yamada

**“UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS DE HORTIFRÚTI E APLICAÇÃO DE PRESSÕES
SELETIVAS EM BACTÉRIAS DO GÊNERO *Komagataeibacter* PARA A
PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS”**

Araraquara, SP

2021

Caroline Yamada

“UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS DE HORTIFRÚTI E APLICAÇÃO DE PRESSÕES SELETIVAS EM BACTÉRIAS DO GÊNERO *Komagataeibacter* PARA A PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri

Araraquara, SP

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Y18u Yamada, Caroline

Utilização de resíduos hortifrúti e aplicação de pressões seletivas em bactérias do gênero *Komagataeibacter* para a produção de celulose bacteriana para aplicações biomédicas/Caroline Yamada. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2021.

112f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal- Universidade de Araraquara-UNIARA

Orientador: Prof. Dr. Wilton Rogério Lustrí

1. Celulose bacteriana. 2. Liberação de fármacos. 3. Economia circular. 4. Resíduos agroindustriais. I. Título.

CDU 57.089

CAROLINE YAMADA

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 19 de fevereiro de 2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. WILTON ROGÉRIO LUSTRI
(Orientador) Universidade de Araraquara -
UNIARA



Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof^a. Dr^a. LAÍS RONCALHO DE LIMA
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Dedico este trabalho ao meu avô “Toninho” que sempre se orgulhou das minhas conquistas, que do céu o senhor se alegre dessa também.

AGRADECIMENTOS

“Em um coração onde mora a gratidão, também habitará a felicidade”

Agradeço em especial a minha mãe e irmã por todo o suporte e incentivo que serviram de alicerce para as minhas realizações, sempre me incentivando nos momentos difíceis e compreendendo a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

Ao Professor Rogério pela orientação, incentivo e confiança depositada em mim, pelos ensinamentos e reflexões que me ajudam a crescer não apenas como profissional, mas como pessoa.

Às minhas colegas de laboratório, Sil e Nayara, pela parceria e ajuda em diversos momentos.

Aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este trabalho.

À minha amiga Camilla, que se fez presente mesmo distante, me incentivando e torcendo por mim.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-graduação que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Hernane e a Dra. Lais pelas sugestões e contribuições dadas no exame de qualificação e por aceitarem compor a banca novamente na defesa.

À CAPES pela bolsa e FAPESP pelo auxílio financeiro.

De forma geral agradeço a todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho, participando direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

“Um cientista em seu laboratório não é um mero técnico, é também, uma criança que enfrenta fenômenos naturais que o impressionam como se fossem contos de fada.”

Marie Curie

RESUMO

A celulose bacteriana (CB) é um biopolímero de glicose, produzido especialmente por bactérias do gênero *Komagataeibacter*. Tem potencial para aplicação nas indústrias farmacêutica e biomédica devido às suas propriedades físico-químicas. O alto custo de produção é um grande desafio, o que estimula a busca por meios alternativos de redução desses custos. Os objetivos deste trabalho foram utilizar resíduos de hortifrúti para a produção de CB, utilizando cepas de *K. rhaeticus* AF-1 e *K. hansenii* ATCC 23769, e sua aplicação como suporte para liberação sustentada dos antibióticos rifampicina (RFM), ceftriaxona (CRO) e levofloxacino (LVX). Aplicação de pressões seletivas química e físicas para a obtenção de cepas variantes com maior capacidade de produção de CB. Os extratos dos resíduos de hortifrúti foram obtidos e processados para utilização como meio de cultura. Os cultivos foram incubados durante 7 dias em B.O.D. a 28 ° C. Os resultados demonstraram que *K. rhaeticus* e *K. hansenii* cultivadas em meios utilizando resíduos de hortifrúti foram capazes de produzir CB com elevada capacidade de liberação sustentada dos antibacterianos, LVX e CRO. As pressões seletivas química (pH) e físicas (luz UV, pressão osmótica e temperatura), aplicadas em cultivos de *K. rhaeticus* AF-1, resultaram na seleção de 24 cepas variantes, sendo as submetidas a luz UV por 10 e 15 minutos de maior rendimento em massa seca. As caracterizações físico-químicas demonstraram que a aplicação das pressões seletivas não alterou as propriedades químicas e estruturais na CB. Assim, o aproveitamento de resíduos hortifrúti tem grande potencial para ser utilizado na produção de CB visando uso em medicina, para liberação sustentada de antibacterianos e outras áreas industriais.

Palavras-chaves: Celulose bacteriana, liberação de fármacos, resíduos de hortifrúti

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC), a glucose biopolymer, produced especially by bacteria of the genus *Komagataeibacter*, has potential for application in the pharmaceutical and biomedical industries due to its physicochemical properties. The high cost is a major challenge for large-scale production of BC, which stimulates the search for alternative means of cost reduction. The objectives of this work were to use fruit and vegetable residues for the production of BC, using strains of *K. rhaeticus* AF-1 and *K. hansenii* ATCC 23769, and its application as a support for the sustained release of the antibiotics rifampicin (RFM), ceftriaxone (CRO) and levofloxacin (LVX); application of chemical and physical conditions to obtain variant strains with greater BC production capacity. The extracts of vegetable and fruit residues were obtained and processed for use as a culture medium. Cultures were incubated for 7 days in B.O.D. at 28 ° C. The results showed that *K. rhaeticus* and *K. hansenii* cultivated in mediums using horticultural residues were able to produce BC with high sustained release capacity of antibacterial, LVX and CRO. The chemical (pH) and physical conditions (UV light, osmotic pressure, and temperature), applied to *K. rhaeticus* AF-1 cultivation, resulted in the selection of 22 variant strains, being those submitted to UV light for 10 and 15 minutes of higher dry mass yield. The physical-chemical characterizations demonstrated that the application of selective pressures did not change the chemical and structural properties in BC. Thus, the use of horticultural residues has great potential to be used in the production of BC for use in medicine, for the sustained release of antibacterial and other industrial areas.

Keywords: Bacterial cellulose, drug release, agro-industrial wastes

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura da celulose. As linhas pontilhadas esquematizam as ligações de hidrogênio possíveis (Lustri <i>et al.</i> , 2015).....	12
Figura 2 – Aspecto macroscópico e microscópico da CB de acordo com a condição de cultivo (a) estático e (f) agitado (Adaptado de: Singhsa, Narain and Manuspiya, 2018)	14
Figura 3 – Aplicações de CB em diversas áreas industriais e médicas (Wang, Tavakoli and Tang, 2019)	18
Figura 4 – Exemplos de modificações in situ das membranas de CB para aplicação como suporte de liberação controlada de fármacos (Pötzing, Kralisch and Fischer, 2017)	19
Figura 5 – Esquema do processamento dos resíduos de hortifrúti para a obtenção dos extratos a serem utilizados como meios de cultivo – (A) processamento inicial com a trituração dos resíduos; (B) segundo processamento utilizando os restos sólidos da trituração	25
Figura 6 – Membrana de CB antes (Painel A) e após (Painel B) processamento	27
Figura 7- Modelo hipotético da via para a biossíntese de celulose por <i>K. hansenii</i> a partir de fontes de carbono (Lustri <i>et al.</i> , 2015).....	31
Figura 8 - Aspecto macroscópico das membranas de CB úmidas produzidas por <i>K. hansenii</i> e <i>K. rhaeticus</i> nos meios T100, T70, T40 e T10 após processamento.	33
Figura 9 - Aspecto macroscópico das membranas de CB úmidas produzidas por <i>K. hansenii</i> e <i>K. rhaeticus</i> nos meios M100, M70, M40 e M10 após processamento.	34
Figura 10 - TGA das membranas produzidas por <i>K. rhaeticus</i> nos meios de resíduos triturados	39
Figura 11 – TGA/DTG das membranas produzidas por <i>K. rhaeticus</i> nos meios obtidos por meio da infusão dos resíduos	39
Figura 12 – TGA/DTA das membranas produzidas por <i>K. hansenii</i> nos meios com resíduos triturados.....	40
Figura 13 – Espectros de FT-IR das membranas de CB produzidas por <i>K. rhaeticus</i> nos meios de resíduos de hortifrúti obtidos por meio da trituração dos resíduos (T)	41
Figura 14 - Espectros de FT-IR das membranas de CB produzidas por <i>K. rhaeticus</i> nos meios de resíduos de hortifrúti obtidos por meio da infusão dos resíduos (M)....	41

Figura 15 - Espectros de FT-IR das membranas de CB produzidas por <i>K. hansenii</i> nos meios de resíduos de hortifrúti obtidos por meio da trituração dos resíduos (T).....	42
Figura 16 – MEV da membrana de CB produzida por <i>K. rhaeticus</i> no meio T10 nos aumentos de 25.000x e 50.000x.	43
Figura 17 – MEV da membrana de CB produzida por <i>K. rhaeticus</i> no meio T40 nos aumentos de 25.000x e 50.000x.	43
Figura 18 – MEV da membrana de CB produzida por <i>K. rhaeticus</i> no meio T70 nos aumentos de 25.000x e 50.000x.	44
Figura 19 – MEV da membrana de CB produzida por <i>K. rhaeticus</i> no meio T100 nos aumentos de 25.000x e 50.000x.	44
Figura 20 – MEV da membrana de CB produzida por <i>K. hansenii</i> no meio T70 nos aumentos de 25.000x e 50.000x.	45
Figura 21 – MEV da membrana de CB produzida por <i>K. hansenii</i> no meio T100 nos aumentos de 25.000x e 50.000x.	45
Figura 22 – MEV da membrana de CB produzida por <i>K. rhaeticus</i> no meio M10 nos aumentos de 25.000x e 50.000x.	46
Figura 23 – MEV da membrana de CB produzida por <i>K. rhaeticus</i> no meio M40 nos aumentos de 25.000x e 50.000x.	46
Figura 24 – MEV da membrana de CB produzida por <i>K. rhaeticus</i> no meio M70 nos aumentos de 25.000x e 50.000x.	47
Figura 25– MEV da membrana de CB produzida por <i>K. rhaeticus</i> no meio M100 nos aumentos de 25.000x e 50.000x.	47
Figura 26 – MEV da morfologia da bactéria <i>K. rhaeticus</i> na membrana de CB	48
Figura 27 - MEV da morfologia da bactéria <i>K. hansenii</i> na membrana de CB	48
Figura 28– Resultados dos ensaios de liberação sustentada após 24 horas de liberação de RFM, CRO e LVX utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti.....	53
Figura 29 - Resultados dos ensaios de liberação sustentada após 48 horas de liberação de RFM, CRO e LVX utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti.....	54
Figura 30 - Resultados dos ensaios de liberação sustentada após 72 horas de liberação de RFM, CRO e LVX utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti.....	55

Figura 31 – Resultados dos ensaios de liberação sustentada após liberação de RFM de 96 até 192 horas utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti	56
Figura 32- Resultados dos ensaios de liberação sustentada após liberação de RFM de 216 até 432 horas utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti	57
Figura 33 - Resultados dos ensaios de liberação sustentada após liberação de RFM de 456 até 648 horas utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti	58
Figura 34 – Aspectos morfológicos relacionados a forma e margem das UFC avaliados para a seleção de cepas variantes após a aplicação das pressões seletivas em cultivos de <i>K. rhaeticus</i>	63
Figura 35 – Aspecto macroscópico das colônias de <i>K. rhaeticus</i> antes da aplicação das pressões seletivas	65
Figura 36 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após a exposição a luz UV por 10 minutos. Painel A tamanho original das colônias – Painel B colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas. 66	66
Figura 37 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após a exposição a luz UV por 15 minutos. Painel A tamanho original das colônias – Painel B colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas. 67	67
Figura 38 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após cultivo de bactérias expostas a luz UV por 30 minutos. Painel A tamanho original das colônias – Painel B colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas.	68
Figura 39 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após cultivo com 0,9% de NaCl. Painel A tamanho original das colônias – Painel B colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas.	69
Figura 40 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após cultivo com pH 7. Painel A tamanho original das colônias – Painel B colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas.....	70
Figura 41 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após cultivo com pH 3,5. Painel A tamanho original das colônias – Painel B colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas.....	71

Figura 42 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após cultivo a 20°C. Painel A tamanho original das colônias – Painel B colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas.....	72
Figura 43 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após cultivo a 25°C. Painel A tamanho original das colônias – Painel B colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas.....	73
Figura 44 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após cultivo a 35°C. Painel A tamanho original das colônias – Painel B colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas.....	74
Figura 45 - Cultivo em triplicada e aspecto macroscópico das membranas de CB produzidas após a aplicação da pressão seletiva Temperatura. Painel A-1 e A-2 membranas de CB produzidas após o cultivo a 20°C. Painel B-1 e B-2 membranas de CB produzidas após o cultivo a 25°C. Painel C-1 e C-2 membranas de CB produzidas após o cultivo a 35°C	75
Figura 46 - Cultivo em triplicada e aspecto macroscópico das membranas de CB produzidas após a aplicação da pressão seletiva exposição à luz UV. Painel A-1 e A-2 membranas de CB produzidas após exposição à luz UV por 10 minutos. Painel B-1 e B-2 membranas de CB produzidas após exposição à luz UV por 15 minutos e Painel C-1 e C-2 membranas de CB produzidas após exposição à luz UV por 30 minutos.	76
Figura 47 - Cultivo em triplicada e aspecto macroscópico das membranas de CB produzidas após a aplicação da pressão seletiva pH. Painel A-1 e A-2 membranas de CB produzidas após cultivo em pH 3,5. Painel B-1 e B-2 membranas de CB produzidas após cultivo em pH 7.....	77
Figura 48 - Cultivo em triplicada (Painel A-1) e aspecto macroscópico das membranas (Painel A-2) de CB produzidas após a aplicação da pressão seletiva Pressão osmótica	78
Figura 49 - Espectros de FT-IR das membranas de CB produzidas após a aplicação da pressão seletiva temperatura	80
Figura 50 - Espectros de FT-IR das membranas de CB produzidas após a aplicação da pressão seletiva exposição a luz UV	80
Figura 51 - Espectros de FT-IR das membranas de CB produzidas após a aplicação da pressão seletiva pH.....	81

Figura 52 - Espectros de FT-IR das membranas de CB produzidas após a aplicação da pressão seletiva pressão osmótica	81
Figura 53 – MEV das membranas produzidas após a aplicação da pressão seletiva temperatura nos aumentos de 25.000x e 50.000x	83
Figura 54 - MEV das membranas produzidas após a aplicação da pressão seletiva exposição a luz UV nos aumentos de 25.000x e 50.000x.....	85
Figura 55 - MEV das membranas produzidas após a aplicação da pressão seletiva em diferentes pH nos aumentos de 25.000x e 50.000x	86
Figura 56 - MEV das membranas produzidas após a aplicação da pressão seletiva pressão osmótica nos aumentos de 25.000x e 50.000x	87
Figura 57 - Resultados dos ensaios de liberação sustentada de CRO nos tempos de 24 e 48 horas de liberação, utilizando membranas de CB produzidas após a aplicação das pressões seletivas	89
Figura 58 - Resultados dos ensaios de liberação sustentada de LVX nos tempos de 24, 48 e 72 horas de liberação, utilizando membranas de CB produzidas após a aplicação das pressões seletivas	91

Lista de Tabelas

Tabela 1- Resíduos utilizados para a obtenção dos extratos	24
Tabela 2– <i>Rms</i> das membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti por <i>K. rhaeticus</i>	35
Tabela 3– <i>Rms</i> das membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti por <i>K. hansenii</i>	35
Tabela 4 – Análise comparativa do preço por litro dos reagentes utilizados na confecção dos meios de cultivos utilizados na produção de CB, relacionados com o <i>Rms</i> obtido.	36
Tabela 5 – Porcentagem de intumescimento das membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti por <i>K. rhaeticus</i>	37
Tabela 6 - Porcentagem de intumescimento das membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti por <i>K. hansenii</i>	38
Tabela 7- Medida dos halos de inibição de crescimento bacteriano utilizando membranas de CB como suporte para a liberação de CRO	49
Tabela 8- Medida dos halos de inibição de crescimento bacteriano utilizando membranas de CB como suporte para a liberação de LVX.	50
Tabela 9 – Medida dos halos de inibição de crescimento bacteriano utilizando membranas de CB como suporte para a liberação de RFM	52
Tabela 10 – <i>Rms</i> e % <i>Int</i> das membranas produzidas após a aplicação das diferentes pressões seletivas.....	79
Tabela 11 – Medida dos halos de inibição do crescimento bacteriano utilizando as membranas de CB obtidas após a aplicação das pressões seletivas para a liberação de CRO	88
Tabela 12 - Medida dos halos de inibição do crescimento bacteriano utilizando as membranas de CB obtidas após a aplicação das pressões seletivas para a liberação de LVX	90

Lista de Abreviaturas

ATCC - American Type Culture Collection

B.O.D. - Biochemical Oxygen Demand

BHI – Brain Heart Infusion

CB – Celulose Bacteriana

CRO – Ceftriaxona

CV – Celulose Vegetal

DTG – Termogravimetria derivada

FRU – Meio Frutose

G. hansenii – *Gluconacetobacter hansenii*

G. xylinus – *Gluconacetobacter xylinus*

HS – Hestrin-Schramm

Int – Intumescimento

K. hansenii – *Komagataeibacter hansenii*

K. rhaeticus – *Komagataeibacter rhaeticus*

LVX - Levofloxacino

M10 - Meio de resíduos obtidos por infusão na concentração de 10%

M100 - Meio de resíduos obtidos por infusão sem diluir

M40 - Meio de resíduos obtidos por infusão na concentração de 40%

M70 - Meio de resíduos obtidos por infusão na concentração de 70%

MH – Muller-Hinton

RFM – Rifampicina

Rms – Rendimento em massa seca

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

T10 - Meio de resíduos triturados na concentração de 10%

T100 – Meio de resíduos triturados sem diluir

T100H - Meio de resíduos triturados sem diluir para *K. hansenii*

T40 - Meio de resíduos triturados na concentração de 40%

T70 – Meio de resíduos triturados na concentração de 70%

T70H - Meio de resíduos triturados na concentração de 70% para *K. hansenii*

TGA – Análise termogravimétrica

UFC – Unidade formadora de colônia

UV- Ultravioleta

YMK – Yamanaka

ZH - Zhou

Sumário

1. Introdução e Revisão da literatura.....	12
1.1. Celulose bacteriana (CB)	12
1.2. Reaproveitamento de resíduos e economia circular	15
1.3. Utilização de resíduos para a produção de CB	16
1.4. Aplicações de CB	17
1.5. CB como suporte de liberação de fármacos.....	18
2. Objetivos	20
2.1. Objetivos gerais.....	20
2.2. Objetivos específicos	20
Capítulo 1	22
1. Materiais e métodos	23
1.1. Reagentes	23
1.2 Cepas bacterianas	23
2. Metodologia.....	23
2.1. Obtenção e processamento dos resíduos de hortifrúti para obtenção dos extratos a serem utilizados como fonte de nutrientes na produção de CB	23
2.2. Reativação das cepas bacterianas.....	25
2.3. Preparo do pré-inóculo bacteriano	26
2.4. Produção de CB utilizando os extratos obtidos a partir do processamento dos resíduos de hortifrúti.....	26
2.5. Processamento das membranas de CB obtidas	26
2.6. Análise do rendimento em massa seca (<i>Rms</i>) das membranas de CB	27
2.7. Estudo de intumescimento (<i>%Int</i>).....	27

2.8. Intumescimento das membranas de CB com fármacos e teste de liberação por disco difusão	28
2.9. Caracterização das membranas de CB obtidas	29
3. Resultados e discussão.....	30
3.1. Produção de CB nos meios de resíduos de hortifrúti	30
3.2. Análise do <i>Rms</i> das membranas produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti	35
3.3. Intumescimento das membranas produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti	37
3.4. Caracterização físico-química das membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti.....	38
3.4.1. Análise termogravimétrica (TGA/DTG).....	38
3.4.2. Análise por FT-IR	40
3.4.3. Análise por Microscopia eletrônica de varredura.....	42
3.5. Liberação de CRO utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti.....	49
3.6. Liberação de LVX utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti	50
3.7. Liberação de RFM utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti.....	51
Capítulo 2.....	60
1. Metodologia.....	61
1.2. Aplicação de pressões seletivas em cultivo de <i>K. rhaeticus</i> AF-1.....	61
1.2.1. Exposição a luz UV	61
1.2.2. Diferentes temperaturas	61
1.2.3. Diferentes valores de pH.....	62

1.2.4. Pressão osmótica.....	62
1.3. Seleção de colônias após aplicação das pressões seletivas química e físicas.	62
1.4. Produção de CB utilizando as colônias obtidas após a aplicação das pressões seletivas química e físicas.....	63
1.5. Processamento das membranas das membranas produzidas após a aplicação das pressões seletivas química e físicas	64
1.6. Análise de <i>Rms</i> das membranas produzidas após a aplicação das pressões seletivas	64
1.7. Análise de intumescimento das membranas produzidas após a aplicação das pressões seletivas.....	64
1.8. Caracterização físico-química das membranas produzidas após a aplicação das pressões seletivas.....	64
2. Resultados	65
2.1. Seleção de colônias de <i>K. rhaeticus</i> com características morfológicas diferentes	65
2.2. Produção das membranas de CB após aplicação das pressões seletivas.....	74
2.3. Análise do <i>Rms</i> e <i>%Int</i> das membranas de CB produzidas após a aplicação das pressões seletivas.....	78
2.4. Caracterização físico-química das membranas de CB.....	79
2.4.1. FT-IR	79
2.4.2. Caracterização por MEV	81
2.5. Liberação de CRO utilizando as membranas de CB como suporte	88
2.6. Liberação de LVX utilizando membranas de CB como suporte	90
3. Conclusões.....	93
4. Perspectivas.....	95
5. Referências	96

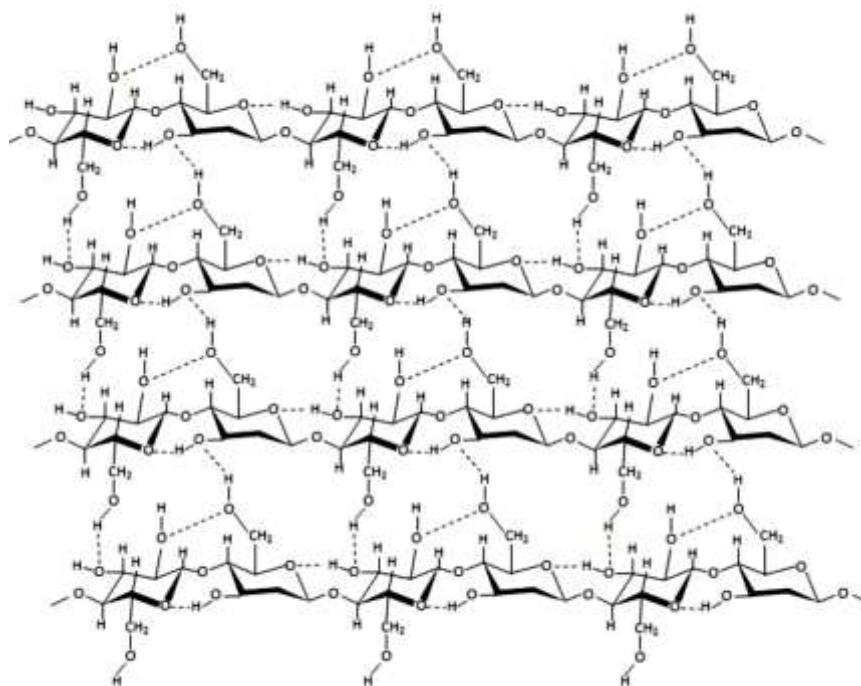
1. Introdução e Revisão da literatura

1.1. Celulose bacteriana (CB)

A celulose é o composto orgânico mais abundante e renovável da natureza, sendo principalmente oriunda de vegetais. Contudo, a celulose vegetal (CV) encontra-se associada com hemicelulose e lignina, de tal modo que sua extração geralmente requer a utilização de produtos químicos corrosivos, prejudiciais ao ambiente e responsáveis por maiores custos e tempo de processamento, o que reduz o leque de aplicações da celulose vegetal e limitam seu uso em áreas mais específicas como, por exemplo, a biomédica (Duarte *et al.*, 2019).

Descrita pela primeira vez em 1886 por Brown, a CB demonstrou ser um biopolímero de grande interesse para aplicação em várias áreas industriais e médicas, devido às suas características estruturais (Figura 1), as quais demonstram serem vantajosas em relação à CV (Ul-Islam, Khan and Park, 2012; Shah *et al.*, 2013; Cacicedo *et al.*, 2016). Embora sua estrutura seja idêntica à da CV, constituída por ligações do tipo- β -(1 \rightarrow 4) glicosídicas, a CB é desprovida de lignina, pectina e hemicelulose, o que lhe confere um elevado grau de pureza (Kumar *et al.*, 2019).

Figura 1 - Estrutura da celulose. As linhas pontilhadas esquematizam as ligações de hidrogênio possíveis (Lustri *et al.*, 2015)



Além da pureza, as fibras da CB apresentam dimensões nanométricas e conferem propriedades físico-químicas distintas, dentre as quais se destacam a capacidade de retenção de água, resistência mecânica e a tração, biocompatibilidade, hipoalergenicidade e elevada cristalinidade, tais propriedades fazem desse biopolímero um material promissor para uma vasta gama de aplicações tecnológicas (Pietak *et al.*, 2007; Keskin, Sendemir Urkmez and Hames, 2017; Duarte *et al.*, 2019).

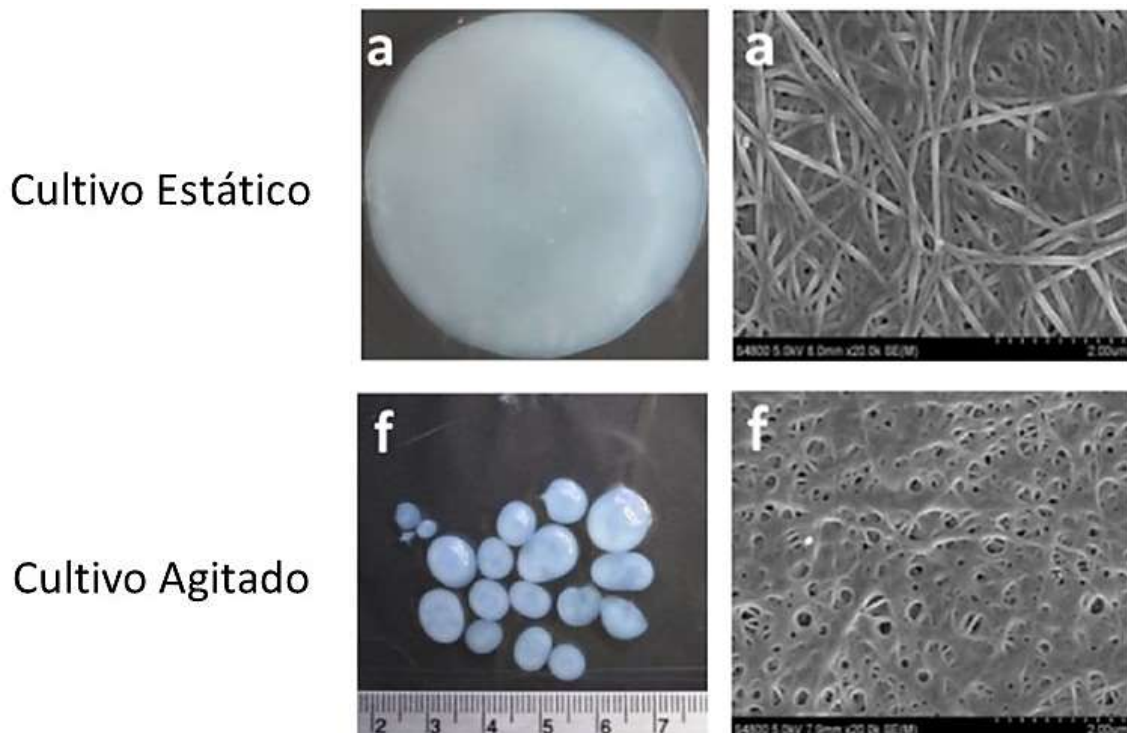
Podendo ser produzida por várias espécies tais como plantas, algas e alguns gêneros de bactérias como *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Salmonella*, *Escherichia* e *Sarcina* (Ullah *et al.*, 2016; Islam *et al.*, 2017). Um destaque especial tem-se dado à celulose produzida por bactérias da família Acetobacteraceae principalmente do gênero *Gluconacetobacter* (Cacicedo *et al.*, 2016), posteriormente nomeadas de *G. xylinus* e *G. hansenii*, sendo atualmente, classificadas no gênero *Komagataeibacter* (Yamada, 2014).

Estudos relatam que as condições de cultivo influenciam na produção de CB, Jung e colaboradores (Jung, Jeong, *et al.*, 2010) mostraram que uma produção mais eficiente em pH 6,5. Em relação à temperatura, Son e colaboradores (Son *et al.* 2001) relatam que a 30°C há uma maior produção, concluindo também que a temperatura afeta não só a produtividade, como também a morfologia e cristalinidade do polímero.

A CB pode ser produzida em condições de cultivos estáticos e agitados (Figura 2). Os cultivos estáticos, necessitam de incubação por vários dias até que uma membrana seja formada na interface ar-meio de cultivo ocupando toda superfície do meio, se moldando ao formato do frasco de cultivo (Iguchi, Yamanaka and Budhiono, 2000). A produção de CB em cultivo agitado é mais rápida e, normalmente leva à produção de CB em forma de corpos esféricos, estrelados ou filamentosos com diâmetro variável, contudo o rendimento é bem menor do que a aquele obtido em cultivo estático (Recouvreux, 2008). Estudos mostraram que, ao contrário do cultivo estático, o volume do meio de cultivo em condições agitadas influencia diretamente no rendimento da produção de CB, pelo fato de proporcionar maior aeração. Existem relatos na literatura de que, em cultivo agitado, além da produção de mutantes espontâneos não produtores de celulose, pode ocorrer redução do grau de polimerização e do grau de cristalinidade, devido à agitação proporcionar uma maior força de cisalhamento no cultivo (Hestrin and Schramm, 1954; Jung *et al.*, 2010).

Esses mesmos autores relatam que a adição de etanol ao meio de cultivo evita produção de mutantes espontâneos.

Figura 2 – Aspecto macroscópico e microscópico da CB de acordo com a condição de cultivo (a) estático e (f) agitado (Adaptado de: Singhsa, Narain and Manuspiya, 2018)



A utilização de diferentes meios de cultivo bem como fontes de carbono variadas para a produção de CB, também são descritos na literatura. Ruka e colaboradores (Ruka *et al.*, 2012), utilizaram meios de cultivo previamente descritos na literatura para um comparativo na produção de CB, utilizando cinco meios de cultivos contendo não apenas fontes de carbonos em concentrações variadas, como também diferentes nutrientes em cada um dos meios. Mohammadkazemi e colaboradores (Mohammadkazemi *et al.* 2015) testaram os três meios mais descritos na literatura como produtores de CB o Hestrin-Schramm (HS) , o Yamanaka (YMK) e o Zhou (ZH), alterando a fonte de carbono utilizada, os pesquisadores testaram manitol, sacarose e por fim xarope de tâmara, obtendo um maior rendimento em massa seca das membranas produzidas no meio ZH utilizando manitol como fonte de carbono. Mikkelsen e colaboradores (Mikkelsen *et al.*, 2009) realizaram estudos com seis fontes de carbono diferentes (glicose, glicerol, manitol, frutose, sacarose e

galactose) nas mesmas concentrações e obtiveram resultados indicando que o rendimento de CB foi maior utilizando manitol como fonte de carbono.

A seleção de cepas bacterianas com maior capacidade de produção de CB é outra estratégia a ser investigada com a finalidade de aumento de produção. Lazarini e colaboradores (Lazarini *et al.*, 2018) obtiveram, a partir de aplicação de pressões seletivas química (diferentes pH) e físicas (diferentes temperaturas e tempos de exposição a luz UV) em cultivos de *G. hansenii*, uma cepa bacteriana com maior rendimento em massa seca, quando comparado com a cepa original.

1.2. Reaproveitamento de resíduos e economia circular

O modelo econômico predominante desde a industrialização é o linear, onde extrai-se a matéria prima, produz-se um bem, tal bem é consumido e em seguida descartado. Como resultado há a extração contínua de recursos naturais e também o descarte acelerado e precoce dos bens consumidos (Foster *et al.* 2016).

Em contrapartida a esse cenário, surgiu a Economia Circular (EC) com a proposta de reinserção dos resíduos no ciclo produtivo, visando minimizar a deposição no ambiente e conseqüentemente evitando a geração de impactos ambientais negativos. (Foster *et al.* 2016; Freitas *et al.* 2017). Os três princípios que descrevem a EC são a natureza como modelo, a natureza como medida e a natureza como um mentor, reforçada pela ideia de que na natureza nada se cria, tudo se transforma (Leitão, 2015).

Na EC os produtos que estão no final de sua vida útil são transformados em recursos para outros produtos, sendo assim gerando riquezas e criando empregos e, ainda, melhorando a qualidade de vida, diminuindo impactos ambientais (Ferreira, Silva and Ferreira, 2017).

Segundo dados de 2017, o Brasil é o quarto maior país em geração de resíduos por ano (cerca de 78 milhões de toneladas por ano), atrás apenas de China, Estados Unidos e Índia (Freitas *et al.* 2017). Calcula-se que um brasileiro produz, em média, 1kg de resíduo por dia e deste montante, aproximadamente 500g é composto de matéria orgânica (Foster, Roberto and Igari, 2016). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, em 2018, mais de uma tonelada

de alimentos destinados para o consumo humano perdeu-se ou foi desperdiçado entre o local de produção e o de consumo (Jesus and Pires, 2018).

Os maiores impactos ambientais provocados por resíduos orgânicos, como os agroindustriais, são decorrentes da decomposição do material, podendo ocasionar a formação de ácidos orgânicos com geração de maus odores e diminuição do oxigênio dissolvido em águas superficiais. Devido à quantidade de nutrientes disponíveis nos resíduos agroindustriais, esses podem ser convertidos em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários, como por exemplo para a síntese de CB, utilizando um resíduo na produção de um produto com alto valor agregado (Duarte *et al.*, 2019).

1.3. Utilização de resíduos para a produção de CB

O elevado custo de produção de CB constitui um grande desafio a ser superado, o que incentiva o desenvolvimento de pesquisas para a descoberta de métodos que visam aumentar sua produção com menor custo possível o que ressalta a extrema importância da pesquisa nessa área (Ruka, Simon and Dean, 2012).

Sendo assim, pesquisadores exploram a utilização de resíduos agrícolas e industriais para a produção de CB. Alguns exemplos são, Korosumi e colaboradores (Kurosumi *et al.*, 2009), que utilizaram sucos de frutas como meio para a produção de CB, obtendo resultados promissores utilizando suco de uva. Kumar e colaboradores (Kumar *et al.*, 2019), que obtiveram uma produção de CB no suco de tomate elevada se comparado com os meios descritos na literatura para a produção de CB.

Fan e colaboradores (Fan *et al.*, 2016) utilizaram casca e bagaço de frutas cítricas provenientes de processamentos de uma indústria de fabricação de sucos, demonstrando a possibilidade do uso desse tipo de resíduo para a produção de CB, indicando que não ocorreram alterações nas propriedades físico-químicas das membranas de CB, sendo portanto, mais economicamente viável e ecologicamente correta a utilização de resíduos se comparado com meios sintéticos como o HS. Outro estudo realizado por Jahan e colaboradores (Jahan, Kumar and Saxena, 2018), utilizou efluente residual de destilarias com composição aproximada de 4% de fontes de carbono, 0,15% de fontes de nitrogênio, grande concentração de íons metálicos e pH de 4,75, os resultados indicaram a produção de CB tanto no seu estado puro, como

também com o acréscimo de 2% de sacarose, onde a produção de CB no meio com 2% de sacarose foi levemente superior, se comparado com o efluente sem nenhuma modificação.

Outros resíduos já foram descritos na literatura para a produção de CB, como casca de uva e madeira industrial (Carreira *et al.*, 2011), resíduos de glicerol obtidos a partir do processamento de biodiesel (Ho Jin *et al.*, 2019), água residual do processamento de jujuba (Li *et al.*, 2015), resíduos de extrato de tabaco (Ye *et al.*, 2019), produtos residuais da produção de óleo de oliva (Gomes *et al.*, 2013), casca de batata (Abdelraof, Hasanin and El -Saied, 2019), casca de noz pecan (Dórame-Miranda *et al.*, 2019), onde em todos os casos mesmo sem aumento na produção, foi observada a diminuição nos custos.

1.4. Aplicações de CB

Devido suas propriedades a CB apresenta uma gama de aplicações (Figura 3) em áreas biomédicas, alimentícias e industriais. No campo da biomedicina a CB tem seu destaque na aplicação como barreira física, atuando na cicatrização de feridas (Fu *et al.*, 2012; Ul-Islam *et al.*, 2013; Cacicedo *et al.*, 2016; de Oliveira Barud *et al.*, 2016), vasos sanguíneos (Andrade *et al.*, 2013), como *scaffolds* para engenharia de tecidos (Lustri *et al.*, 2015) e como suporte para liberação controlada de fármacos (Lazarini *et al.*, 2016). Algumas aplicações alimentícias são a produção de nata de coco, uma sobremesa popular em países da Ásia como Indonésia e Japão e o uso de CB em alimentos na forma de aditivos de baixa caloria ou também como embalagens de alimentos. Outro campo onde explora-se o uso da CB é na eletrônica, onde foram desenvolvidas membranas com alta condutividade elétrica e dispositivos emissores de luz por meio da incorporação de metais na estrutura da celulose (Duarte *et al.*, 2019).

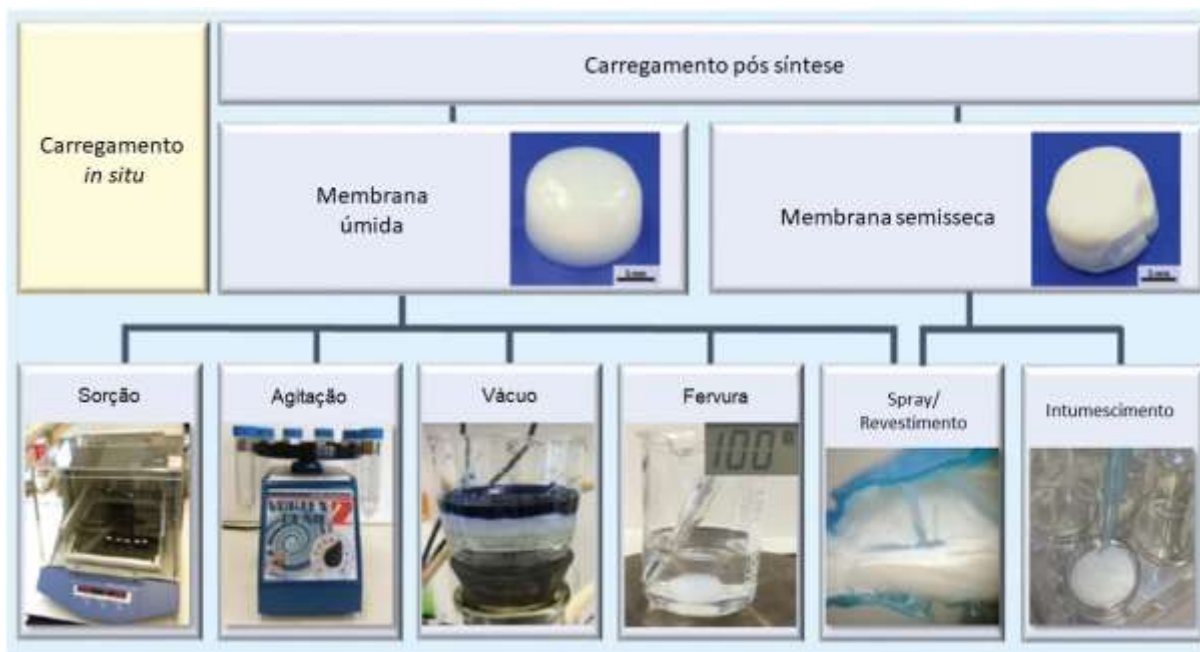
Figura 3 – Aplicações de CB em diversas áreas industriais e médicas (Wang, Tavakoli and Tang, 2019)



1.5. CB como suporte de liberação de fármacos

A elaboração de dispositivos de liberação controlada de fármacos é um campo da tecnologia farmacêutica em expansão. Uma liberação controlada de fármacos bem-sucedida é influenciada por vários fatores, um dos quais é a identificação adequada de materiais para pesquisa e engenharia de novos sistemas de distribuição de medicamentos. A CB é um biopolímero que cumpre os critérios para a utilização como dispositivos de liberação controlada de medicamentos. Apresentando versatilidade em termos de seu potencial para modificação *in situ* (Figura 4) e modificação química após síntese ampliando assim a visão sobre o uso da CB, facilitando a investigação de seu potencial para aplicação na liberação de fármacos (Abeer, Mohd Amin and Martin, 2014).

Figura 4 – Exemplos de modificações in situ das membranas de CB para aplicação como suporte de liberação controlada de fármacos (Pötzing, Kralisch and Fischer, 2017)



Uma das aplicações da CB é a utilização em formulações tópicas e transdérmicas para melhorar os resultados clínicos. Esses sistemas podem atuar como uma porta de entrada para a CB no domínio dos sistemas de liberação de drogas. A utilização de CB para a cicatrização de feridas já é descrita na literatura, facilitando a utilização para liberação tópica e transdérmica de fármacos (Czaja *et al.*, 2006).

Os sistemas de liberação tópicos e transdérmicos podem funcionar bilateralmente, tanto para entregar drogas quanto para absorver exsudatos, representando uma excelente oportunidade para a aplicação de membranas CB. Alguns dos outros benefícios na utilização de CB é a manutenção da umidade, pois evita que a umidade evapore, evita contaminação e mantém contato íntimo com a área exposta, inflamada ou doente facilitando a liberação do medicamento ao local de destino (Czaja *et al.*, 2006).

Um estudo realizado por Almeida e colaboradores (Almeida *et al.*, 2014) utilizou membranas CB com e sem glicerina onde, a membrana com glicerina proporcionou efeito hidratante da pele, o que não foi observado para a membrana sem glicerina. A boa tolerância cutânea encontrada após uma única aplicação reforça o interesse na utilização das membranas de CB como suporte para aplicação tópica de fármacos. A

inclusão da glicerina, além de modificar as propriedades mecânicas, promoveu efeito hidratante da pele que resultou em uma característica clinicamente relevante para o tratamento de doenças cutâneas caracterizadas pelo ressecamento, como psoríase e dermatite atópica.

Silva e colaboradores (Silva *et al.*, 2014) utilizaram membranas de CB com diclofenaco, sugerindo que essa tecnologia pode ser aplicada com sucesso na administração de diclofenaco com a vantagem da fácil aplicação, simplicidade de preparação e estrutura de camada única.

Em um estudo realizado por Shao e colaboradores (Shao *et al.*, 2016), a membrana de CB foi carregada com cloridrato de tetraciclina, indicando que as membranas de foram capazes de controlar a liberação do medicamento, sem apresentar citotoxicidade em linhagens de células HEK293.

Além dos usos descritos, também são relatados na literatura a utilização de membranas de CB com cloreto de benzalcônio (Wei, Yang and Hong, 2011), nanopartículas de prata (Jung *et al.*, 2009; Barud *et al.*, 2011), ceftriaxona (Lazarini *et al.*, 2016), ibuprofeno e lidocaína (Trovatti *et al.*, 2012).

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivos gerais a produção de CB, por *K. hansenii* e *K. rhaeticus* a partir da utilização de resíduos de hortifrúti como fontes de nutrientes e a aplicação de pressões seletivas físicas e química em cultivo de *K. rhaeticus*, para utilização como suporte para a liberação sustentada de fármacos antibacterianos.

2.2. Objetivos específicos

O desenvolvimento dos Objetivos Específicos foi dividido em dois capítulos:

CAPÍTULO 1

2.2.1. Produzir meios de cultivo utilizando de resíduos de hortifrúti para a produção de CB por e *K. hansenii* ATCC 23769 e *K. rhaeticus* AF1;

2.2.2. Determinar o rendimento em massa seca e a porcentagem de intumescimento das membranas de CB produzidas por *K. hansenii* e *K. rhaeticus* nos meios de resíduos;

2.2.3. Caracterizar por análise termogravimétrica (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) as membranas de CB produzidas por *K. hansenii* e *K. rhaeticus* nos meios utilizando resíduos de hortifrúti;

2.2.4. Incorporar os fármacos antibacterianos rifampicina (RFM), ceftriaxona (CRO) e levofloxacino (LVX) nas diferentes membranas de CB obtidas a partir dos meios de resíduos de hortifrúti

2.2.5. Avaliar a cinética de liberação sustentada/controlada desses fármacos pelo método de difusão em disco.

CAPÍTULO 2

2.2.6. Submeter as cepas de *K. rhaeticus* AF1 a pressões seletivas química (variações de pH) e físicas (variação de temperatura, do tempo de exposição à luz ultravioleta e pressão osmótica);

2.2.7. Selecionar unidades formadoras de colônias (UFC) com aspectos macroscópicos diferentes da cepa original;

2.2.8. Produzir membranas de CB utilizando as cepas selecionadas após a aplicação das pressões seletivas;

2.2.9. Determinar o rendimento em massa seca e a porcentagem de intumescimento das membranas de CB produzidas após a aplicação das pressões seletivas química e físicas;

2.2.10. Caracterizar por MEV e FT-IR as membranas de CB produzidas por *K. rhaeticus* após a aplicação das pressões seletivas;

2.2.11. Incorporar os fármacos antibacterianos CRO e LVX nas diferentes membranas de CB obtidas após a aplicação das pressões seletivas;

2.2.12. Avaliar a cinética de liberação sustentada/controlada desses fármacos pelo método de difusão em disco.

Capítulo 1

1. Materiais e métodos

1.1. Reagentes

Os fármacos Ceftriaxona (CRO), Levofloxacino (LVX), Rifampicina (RFM) foram adquiridos dos laboratórios Sigma-Aldrich/Merck. Os meios de cultivo Brain Heart Infusion (BHI), Mueller-Hinton (MH), extrato de levedura e ágar bacteriológico foram adquiridos da empresa Kasvi. Frutose, Etanol absoluto, metanol, ácido acético glacial, hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de potássio (KOH) foram adquiridos da empresa Synth.

1.2 Cepas bacterianas

As cepas bacterianas de *K. hansenii* (ATCC 23769) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), utilizadas no presente trabalho, foram obtidas da Coleção de Culturas da Fundação André Tosello, e *K. rhaeticus* AF-1 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Hernane da Silva Barud, coordenador do Laboratório BioPolMat da Universidade de Araraquara-UNIARA.

2. Metodologia

2.1. Obtenção e processamento dos resíduos de hortifrúti para obtenção dos extratos a serem utilizados como fonte de nutrientes na produção de CB

Os resíduos foram coletados em um comércio local da cidade de Araraquara, a coleta foi realizada a partir de compartimentos de descarte do estabelecimento, onde todos os dias são descartados frutas, verduras e legumes que são considerados impróprios para o consumo *in natura*. Os resíduos utilizados (Tabela 1) foram obtidos de acordo com a disponibilidade do estabelecimento e que, apesar de impróprios para o consumo, não apresentavam estágios avançados de decomposição.

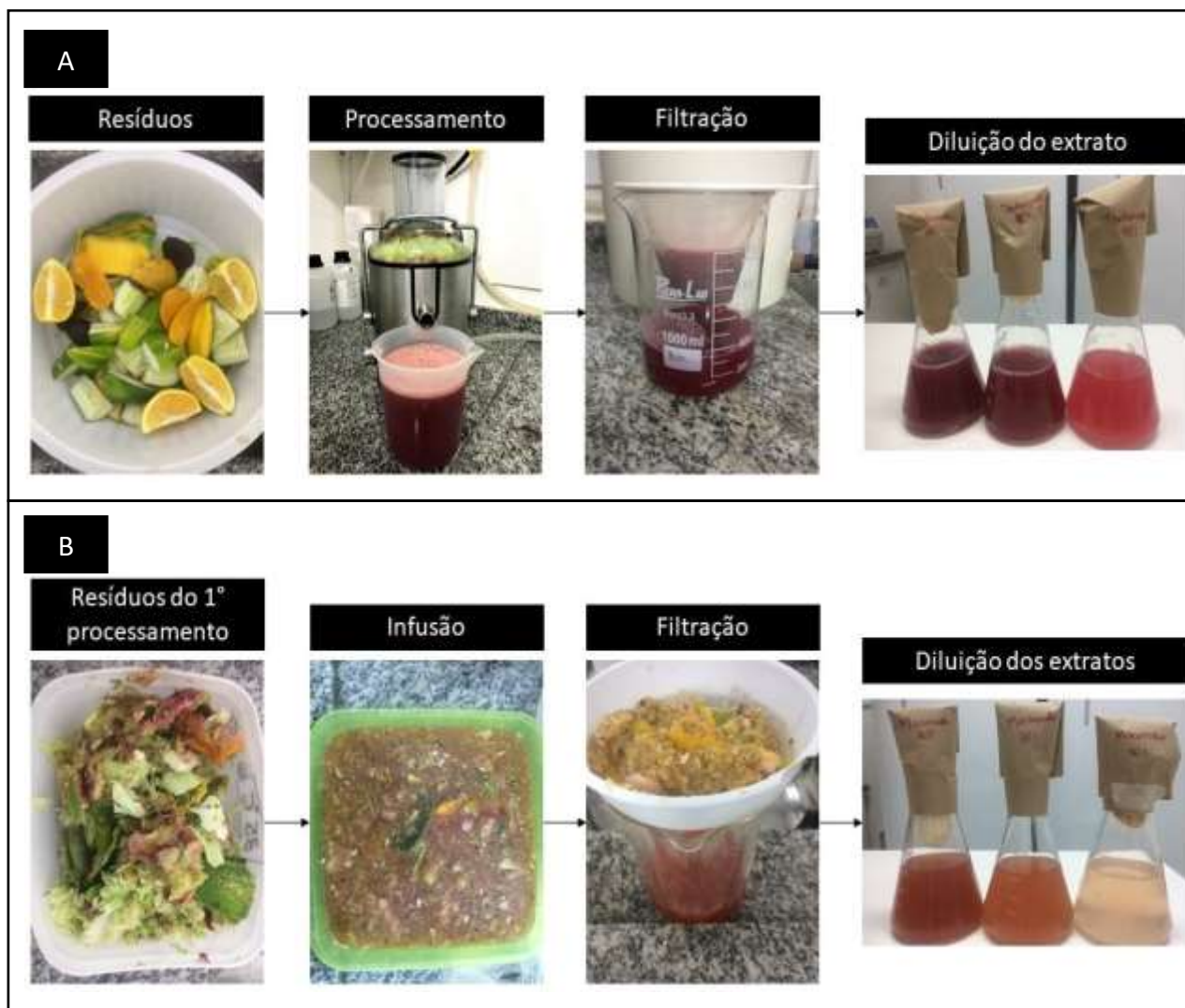
Tabela 1- Resíduos utilizados para a obtenção dos extratos

Resíduo	Massa (g)
Repolho	348, 22
Manga	329, 84
Beterraba	58, 29
Laranja	159, 00
Pepino	951, 85
Batata	100, 34

Os extratos utilizados como meios de cultivo para a produção de CB foram obtidos por meio de dois processamentos, o primeiro processamento (Figura 5 - A) consistiu na trituração dos resíduos em uma centrifuga de alimentos do tipo “*Juicer*”, para obtenção do extrato concentrado. O segundo processamento (Figura 5 – B) consistiu na utilização da parte sólida dos resíduos resultantes do primeiro processamento. Nessa etapa, o resíduo sólido foi colocado em 1 litro de água e mantido a 75°C durante 40 minutos. Após esse período, a suspensão obtida foi peneirada para a obtenção do extrato após infusão.

Os extratos obtidos, a partir dos dois processamentos foram diluídos em água destilada nas concentrações de 70%, 40% e 10%. Os extratos obtidos do primeiro processamento foram designados T100 (extrato puro), T70 (70%), T40 (40%) e T10 (10%) e os extratos obtidos no segundo processamento M100 (extrato concentrado), M70 (70%), M40 (40%) e M10 (10%). Após a diluição, os extratos foram acondicionados em Erlenmeyer e autoclavados a 121°C por 20 minutos para a esterilização, para então serem utilizados como meios de cultivos para a produção de CB.

Figura 5 – Esquema do processamento dos resíduos de hortifrúti para a obtenção dos extratos a serem utilizados como meios de cultivo – (A) processamento inicial com a trituração dos resíduos; (B) segundo processamento utilizando os resíduos sólidos da trituração (Fonte: próprio autor)



2.2. Reativação das cepas bacterianas

As cepas bacterianas a serem utilizadas de *K. hansenii* ATCC 23769 e *K. rhaeticus* AF-1 tanto para o cultivo nos meios de resíduos de hortifrúti como para a aplicação de pressões seletivas, foram mantidas sob refrigeração -80°C em glicerol 20% e reativadas em meio contendo Frutose 60 g/L, Extrato de Levedura 5,6 g/L e Etanol 50 mL/L (FRU) esse cultivo foi mantido sob agitação, em incubadora B.O.D. SL – 200 Solab Científica a 28°C, sob agitação a 250 rpm, por 24h e, posteriormente, mantido em cultivo estático em incubadora B.O.D. a 28°C até a produção de uma membrana de CB. A seguir, o cultivo foi vigorosamente agitado para remoção das

bactérias presas a membrana de CB e a suspensão obtida foi utilizada para o preparo do pré-inóculo.

2.3. Preparo do pré-inóculo bacteriano

A partir das suspensões bacterianas de *K. hansenii* ATCC 23769 e *K. rhaeticus* AF1 obtidas como descrito no item anterior, uma alíquota de 50 mL de cada um dos cultivos bacterianos foi transferido para um Erlenmeyer contendo 150 mL de meio FRU estéril. Os cultivos bacterianos foram mantidos em temperatura de 28°C em incubadora B.O.D., em condição estática, até a formação de uma membrana de CB e crescimento bacteriano. Esses cultivos foram utilizados como pré-inóculos para a produção de membranas de CB nos meios utilizando os extratos obtidos do processamento de resíduos de hortifrúti como fonte de nutrientes e aplicação das pressões seletivas química e físicas.

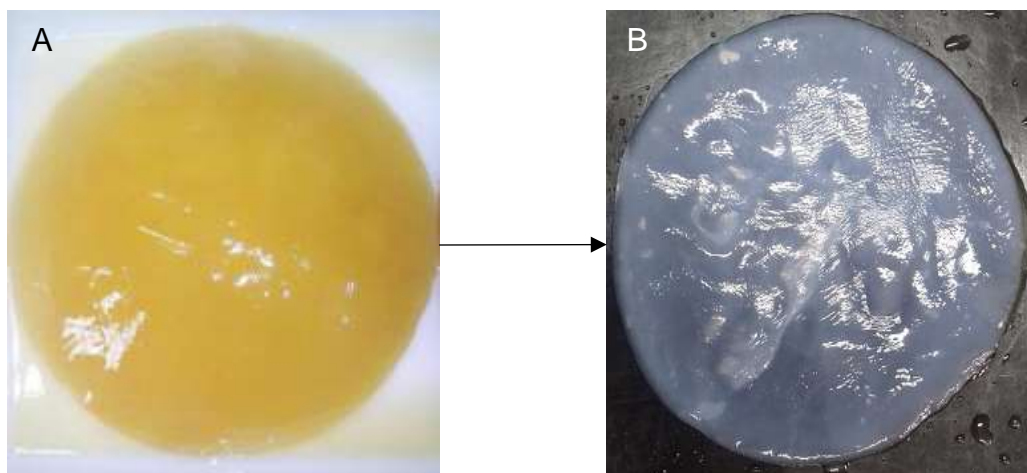
2.4. Produção de CB utilizando os extratos obtidos a partir do processamento dos resíduos de hortifrúti

Para a produção de CB nos meios de resíduos de hortifrúti, os pré-inóculos obtidos como descrito no item 2.3., foram vigorosamente agitados para remoção das bactérias aderidas nas membranas de CB formadas. As suspensões bacterianas tanto de *K. hansenii* ATCC 23769 quanto de *K. rhaeticus* AF-1 obtidas foram diluídas em 40mL dos meios T100, T70, T40, T10, M100, M70, M40 e M10 até atingir a escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ Unidades formadoras de colônias por mL - UFC/mL). Os cultivos foram realizados em triplicata e incubados, estaticamente, em B.O.D. a 28°C por 7 dias.

2.5. Processamento das membranas de CB obtidas

Decorrido os 7 dias de produção as membranas foram retiradas dos meios de cultivo e lavadas em água corrente por 30 minutos para a remoção dos resíduos dos meios, a seguir, as membranas foram imersas em água destilada e mantidas em banho-maria (modelo 500-4D Ethik Technology) a 65°C, com troca periódica de água, até clareamento total (Figura 6). Após esse procedimento, as membranas foram submetidas ao tratamento com NaOH 0,5 M por 30 minutos em banho-maria a 80°C.

Figura 6 – Membrana de CB antes (Painel A) e após (Painel B) processamento (Fonte: próprio autor)



Após o tratamento com o NaOH 0,5M, as membranas foram mantidas em água destilada em banho-maria a 65°C, com troca periódica de água, até a atingir pH 7,0.

Após a neutralização do pH, as membranas foram mantidas em placas de Petri em estufa de secagem e esterilização – 400/1ND – Ethik Technology a 60°C até desidratação completa.

2.6. Análise do rendimento em massa seca (Rms) das membranas de CB

As membranas de CB desidratadas como descrito no item 2.5. foram pesadas em balança analítica Shimadzu AUY 220 e a massa obtida foi utilizada para determinação do rendimento em massa seca aplicando a equação (1):

$$(1) Rms = \frac{1000 \text{ mL} \times Ms}{50 \text{ mL}}$$

Onde Rms corresponde ao rendimento em massa seca das membranas de CB, Ms é corresponde à massa seca da membrana de CB (g) e 50 mL corresponde ao volume utilizado nos cultivos das membranas de CB.

2.7. Estudo de intumescimento (% Int)

O comportamento de intumescimento foi avaliado por imersão das membranas, processadas e secas, em água destilada à temperatura ambiente (25°C) por 4h até atingir o equilíbrio de intumescimento. Após atingir o equilíbrio, as membranas de CB

foram cuidadosamente retiradas e o excesso de água livre da superfície foi removido com papel de filtro, para posterior determinação da massa intumescida em balança analítica Shimadzu AUY 220.

A porcentagem de intumescimento foi realizada utilizando a seguinte expressão (2):

(2)

$$\%Int = \frac{M_{int} - M_s}{M_s} \times 100$$

Onde *%Int* corresponde a porcentagem de intumescimento das membranas de CB, *M_s* corresponde a massa seca das membranas de CB e *M_{int}* corresponde a massa intumescida de CB.

2.8. Intumescimento das membranas de CB com fármacos e teste de liberação por disco difusão

Discos de CB com 10mm de diâmetro foram colocados em placas de 24 poços e submetidas à esterilização sob luz UV por 60 minutos em cabine de segurança biológica com fluxo laminar. Após os 60 minutos, 180 µL de uma solução estoque (20 mg/mL) dos fármacos CRO, LVX e RFM foram colocados sobre os discos de CB. Os discos foram mantidos sob refrigeração (4°C) durante 24h para total intumescimento e garantia da estabilidade dos fármacos.

Após as 24h, os discos de CB intumescidos com os fármacos, foram colocados em temperatura ambiente de 25°C para a completa desidratação. Após a desidratação, os discos de CB foram colocados sobre ágar MH inoculado com *S. aureus* ATCC 25925, espécie bacteriana sensível a todos os antibacterianos testados, (ajustado para escala 0,5 de MacFarland $1,5 \times 10^8$ UFC). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica MARCONI-MA 032/3 a 37°C por 24h.

Decorridas as 24h, os halos de inibição foram mensurados utilizando paquímetro Mitutoyo com precisão de 0,05mm e os discos de CB foram transferidos para uma nova placa de ágar MH inoculada com *S. aureus*, nas mesmas condições descritas. Esse processo foi repetido até que um ou mais discos não apresentassem mais a formação de halos de inibição. Os experimentos foram realizados em triplicata

seguindo a metodologia adaptada do Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (CLSI, 2019).

2.9. Caracterização das membranas de CB obtidas

As membranas de CB obtidas após a produção nos meios de resíduos de hortifrúti foram caracterizadas por análise termogravimétrica (TGA) e por termogravimetria derivada (DTG). As curvas foram obtidas no equipamento TA Instruments SDT q600. As condições empregadas foram: atmosfera de oxigênio com fluxo contínuo de 100 mL/min e taxa de aquecimento de 10°C por minuto. A temperatura utilizada no experimento ficou entre 30-600°C, tendo como referência um cadinho de alumina.

As membranas de CB foram analisadas também por FT-IR com a finalidade de avaliar os principais grupos funcionais, característicos de CB, utilizando o espectrômetro Cary 630 FT-IR Agilent, em modo de transmitância na região de 4000 a 600cm⁻¹.

Para a análise das características morfológicas, como por exemplo as diferenças entre os entrelaçamentos, espessuras das fibras e na porosidade, as membranas de CB foram caracterizadas por MEV, com aumento de 25.000x e 50.000x, utilizando o microscópio JEOL JSM- 6360 LV, após recobrimento com carbono.

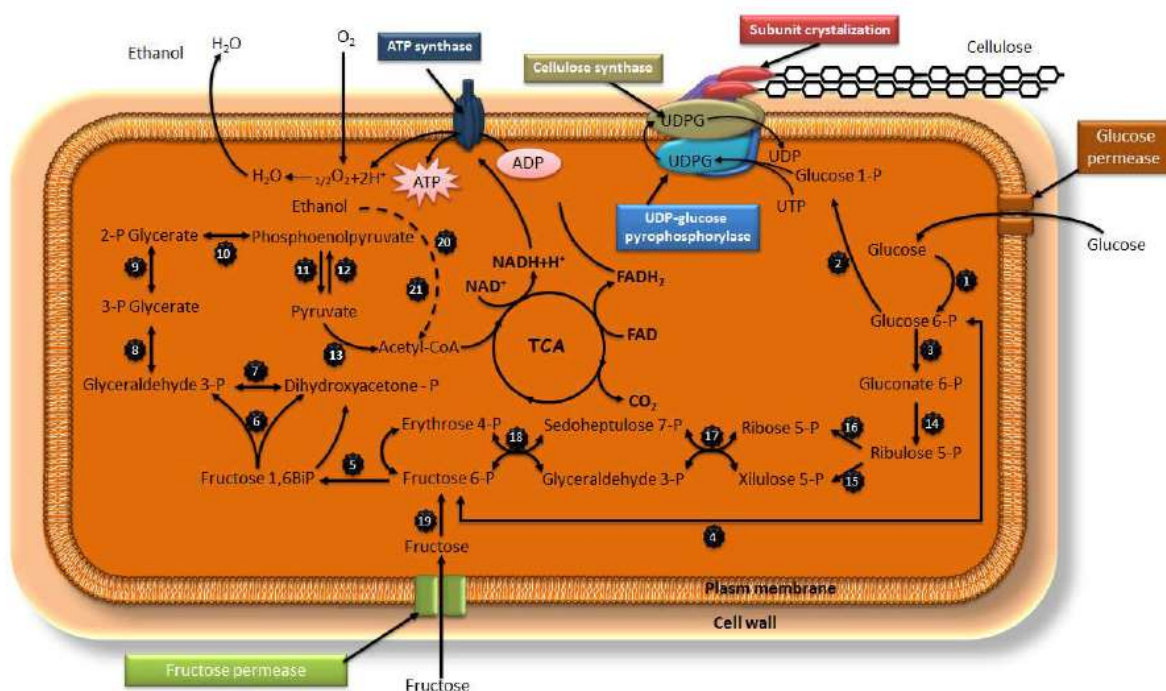
3. Resultados e discussão

3.1. Produção de CB nos meios de resíduos de hortifrúti

A produção das membranas de CB utilizando meios obtidos dos processamentos de resíduos de hortifrúti foi realizado como descrito no item 2.4. Os resultados obtidos demonstram que tanto *K. hansenii* ATCC 23769 quanto *K. rhaeticus* AF-1 foram capazes de produzir membranas de CB em todas as concentrações utilizadas dos extratos nos dois processamentos, embora *K. rhaeticus* tenha demonstrado maior potencial de produção em relação a *K. hansenii*.

O maior potencial de produção de *K. rhaeticus* em relação a *K. hansenii*, pode ser devido a diferenças na ativação das vias metabólicas envolvidas na produção de CB de cada uma das espécies bacterianas, uma vez que as condições de cultivo para ambas as espécies foram as mesmas. Lustri e colaboradores (Lustri *et al.*, 2015), descreveram as vias metabólicas utilizadas por *K. hansenii* ATCC 23769 como pode ser observado na Figura 7. Contudo ainda não há estudos comparativos entre as vias metabólicas de *K. hansenii* e *K. rhaeticus* na produção de CB.

Figura 7- Modelo hipotético da via para a biossíntese de celulose por *K. hansenii* a partir de fontes de carbono (Lustri *et al.*, 2015).



Glicoquinase-ATP (1); fosfoglicomutase (2), glucose-6-fosfato desidrogenase (3); fosfoglicoisomerase (4); frutoquinase ATP (5), aldolase (6); triosefosfato isomerase (7); gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (8); fosfoglicerato-mutase (9), enolase (10); piruvato quinase (11); bifosfato quinase de piruvato (12), piruvato desidrogenase (13); 6-fosfogliconato desidrogenase (14); fosforribulose epimerase (15); fosforribulose isomerase (16); transacetolase (17); transaldolase (18); frutoquinase (19); aldeído desidrogenase (20); álcool desidrogenase (21).

As Figuras 8 e 9 apresentam as diferenças macroscópicas das membranas produzidas pelas diferentes espécies bacterianas nos meios de cultivo com diferentes concentrações de resíduos. Os resultados apresentados nas Figuras reforçam a ideia de diferenças no metabolismo na produção de CB por *K. hansenii* e por *K. rhaeticus*. As membranas produzidas por *K. hansenii* nos meios T40, T10, M100, M70, M40 e M10 apresentaram características físicas incompatíveis para utilização como suporte para liberação de fármacos por se apresentarem extremamente finas e com pouca resistência mecânica. Por esse motivo, as membranas produzidas nesses meios foram descartadas.

As diferenças com relação a resistência mecânica das membranas de CB podem estar relacionadas com a cepa bacteriana utilizada para a produção. Segundo Chen e colaboradores (Chen *et al.*, 2018) que utilizaram seis cepas diferentes da

bactéria *K. xylinus* (ATCC 53524, ATCC 10245, ATCC 23769, ATCC 700178, NBRC 13693, KTH 5655) para a avaliação das propriedades mecânicas de CB, reforçam esses resultados. Os autores calcularam a concentração de CB, dividindo a massa seca pela massa úmida e notaram que as cepas com maior concentração de CB, eram as que apresentavam também propriedades mecânicas melhores. A cepa ATCC 53542 apresentou maior massa úmida, sendo também a que apresentou maior resistência mecânica, enquanto as cepas ATCC 700178 e ATCC 10245 que apresentaram menor massa úmida, foram as de menor resistência mecânica.

Figura 8 - Aspecto macroscópico das membranas de CB úmidas produzidas por *K. hansenii* e *K. rhaeticus* nos meios T100, T70, T40 e T10 após processamento. (Fonte: próprio autor)

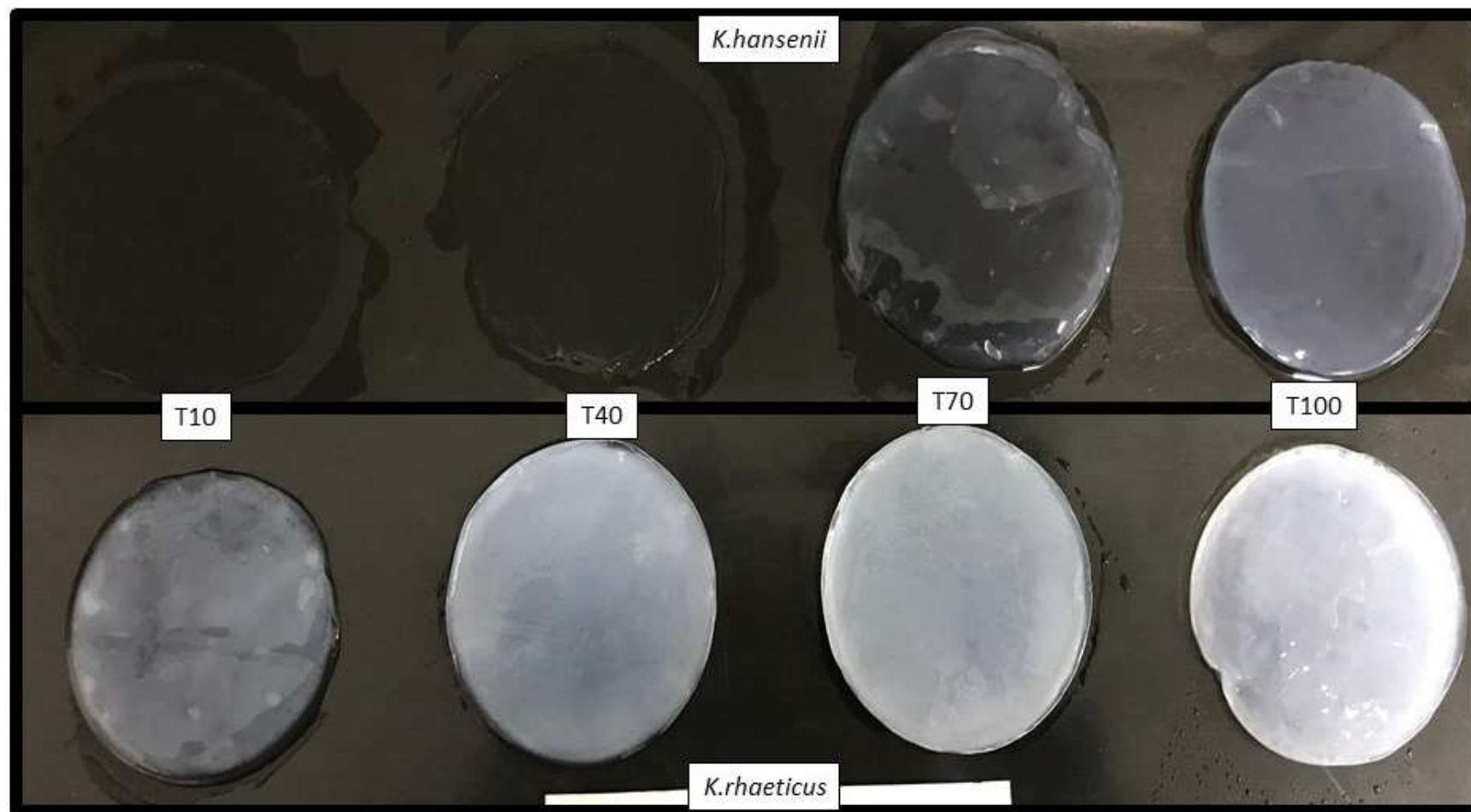
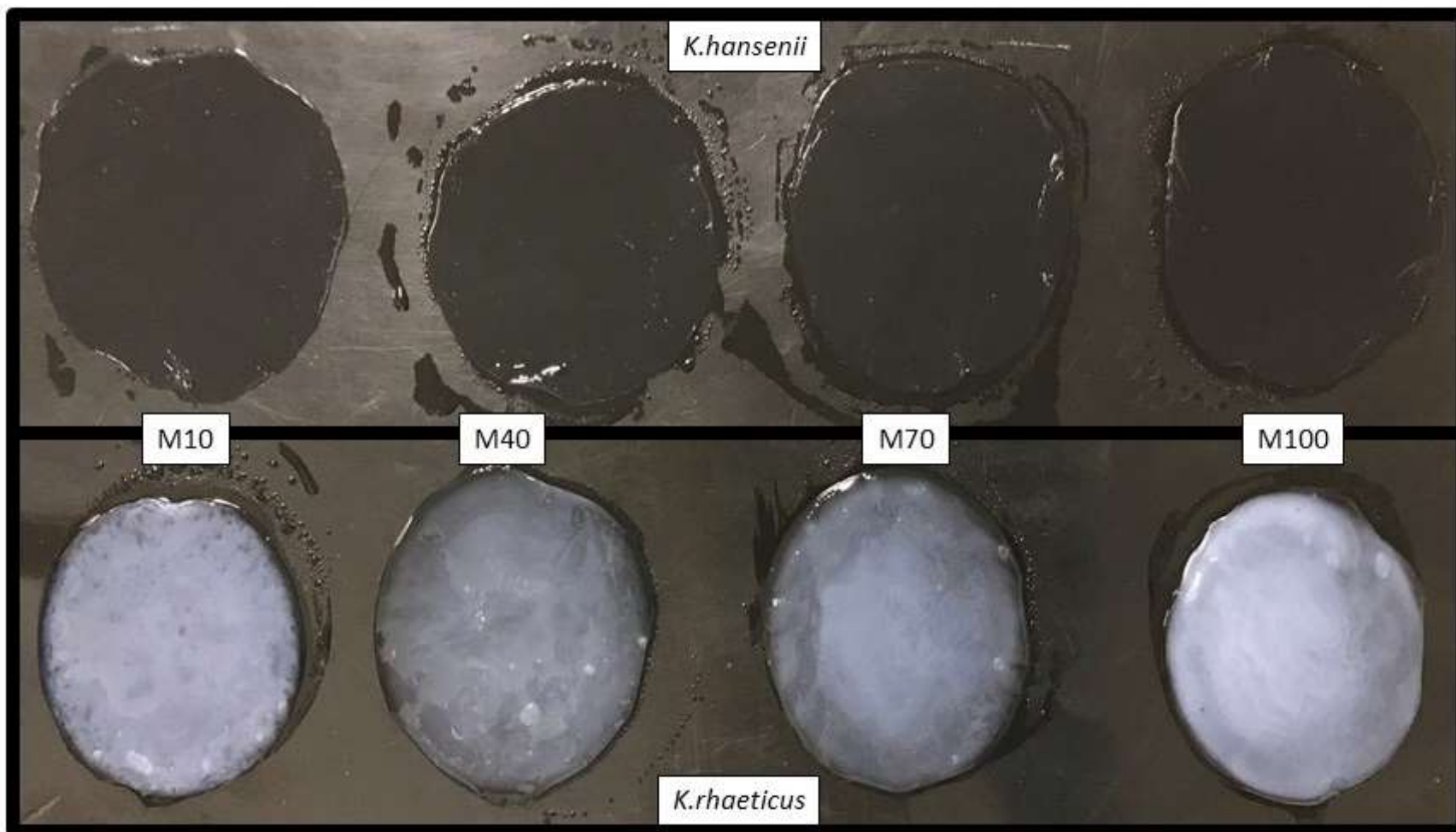


Figura 9 - Aspecto macroscópico das membranas de CB úmidas produzidas por *K. hansenii* e *K. rhaeticus* nos meios M100, M70, M40 e M10 após processamento. (Fonte: próprio autor)



3.2. Análise do *Rms* das membranas produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti

Os resultados obtidos na análise do *Rms* demonstram que a membrana produzida no meio T70 por *K. rhaeticus* demonstrou *Rms* superior, porém não apresentando uma diferença estatisticamente significativa quando comparada com T100, como pode ser observado na Tabela 2. Com relação as membranas produzidas por *K. hansenii* a membrana que apresentou melhor rendimento foi a produzida no meio T70H, entretanto, sem uma diferença significativa quando comparada com T100H, como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 2– *Rms* das membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti por *K. rhaeticus*

MEIO/CB	<i>Rms</i> (g/L)
T100	1,94 *(± 0,13)
T70	2,18 *(± 0,21)
T40	0,50 *(± 0,03)
T10	0,34 *(± 0,03)
M100	0,80 *(± 0,08)
M70	0,50 *(± 0,07)
M40	0,38 *(± 0,02)
M10	0,74 *(± 0,09)

*Desvio Padrão

Tabela 3– *Rms* das membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti por *K. hansenii*

Meio/CB	<i>Rms</i> (g/L)
T100H	0,56 *(± 0,04)
T70H	0,64 *(± 0,05)

* Desvio Padrão

Os resultados obtidos se mostram promissores, uma vez que o *Rms* das membranas produzidas por *K. rhaeticus* nos meios nas duas maiores concentrações de resíduos foram vantajosas se relacionado com o custo de produção das membranas de CB. Na Tabela 4 é possível analisar o custo dos reagentes para a produção de 1L dos meios de cultivos mais descritos na literatura

para a produção de CB, Hestrin Schramm (HS) (HESTRIN and SCHRAMM, 1954), Zhou (ZH) (Zhou *et al.*, 2007) e Yamanaka (YMK)(Yamanaka *et al.*, 1989).

O valor dos reagentes para a confecção de 1L desses meios ficou entre R\$ 31,89 e R\$ 48,56, cotados no site da Sigma/Merk no dia 17 de setembro de 2020. Mohammadkazemi e colaboradores (Mohammadkazemi, *et al.*, 2015), realizaram a análise desses meios de cultivo, utilizando a cepa *G. xylinus* PTCC 1734 e condições de cultivo semelhantes às utilizadas na produção nos meios contendo resíduos como fonte de nutrientes, obtendo os *Rms* exibidos na Tabela 4, com valores inferiores aos obtidos na produção utilizando resíduos de hortifrúti pelos meios T100 e T70, demonstrando o uso promissor desses resíduos, pois os mesmos não foram complementados com fontes adicionais de carbono e nitrogênio, indicando uma diminuição no custo da produção de CB.

Tabela 4 – Análise comparativa do preço por litro dos reagentes utilizados na confecção dos meios de cultivos utilizados na produção de CB, relacionados com o *Rms* obtido.

Meio	Preço (R\$) Reagentes (g/L)	<i>Rms</i> (g/L)
HS	40,81	0,9 *(± 0,3)
ZH	48,56	1 *(± 0,3)
YMK	31,89	1,4 *(± 0,3)
T100	0**	1,94 *(± 0,13)
T70	0**	2,18 *(± 0,21)

* Desvio Padrão, **Resíduos coletados sem custo

Machado e colaboradores (Machado *et al.*, 2018) utilizaram melão, um resíduo do processamento de cana de açúcar, como fonte de carbono para a produção de CB. Os autores utilizaram extrato de levedura como fonte de nitrogênio e diferentes concentrações de glicose e melão como fontes de carbono. Os resultados obtidos demonstraram uma diminuição no custo de produção entre 7,35-20,06%, essa porcentagem variou de acordo com a concentração de glicose utilizada. O meio com uma concentração de 30g/L de glicose e 20g/L de melão apresentou *Rms* de aproximadamente 4 g/L, com uma diminuição de 10,53% no custo de produção comparado com o meio HS. Esses resultados indicam que a suplementação dos resíduos, com uma fonte de carbono adicional, pode ser

vantajosa na produção de CB utilizando resíduos de hortifrúti, mantendo a diminuição dos custos de produção.

3.3. Intumescimento das membranas produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti

O cálculo da porcentagem de intumescimento possibilita uma análise da capacidade que a membrana de CB tem de adsorver água após a desidratação completa, sendo um dado importante para a liberação sustentada, uma vez que possibilita a análise do quanto a membrana de CB foi capaz de adsorver de fármaco. Os resultados obtidos (Tabela 5) indicam que a membrana produzida por *K. rhaiticus* no meio T10 apresentou maior porcentagem de intumescimento, seguida por M10. A Tabela 6 apresenta as porcentagens de intumescimento das membranas de CB produzidas por *K. hansenii*, indicando que T100H obteve uma porcentagem levemente superior que T70H.

Tabela 5 – Porcentagem de intumescimento das membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti por *K. rhaiticus*

Meio/CB	% de intumescimento
T100	80,40
T70	73,09
T40	82,88
T10	94,82
M100	91,13
M70	92,06
M40	89,02
M10	93,04

Tabela 6 - Porcentagem de intumescimento das membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti por *K. hansenii*

Meio/CB	% de intumescimento
T100H	92,95
T70H	91,88

3.4. Caracterização físico-química das membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti

3.4.1. Análise termogravimétrica (TGA/DTG)

As análises termogravimétricas mostraram três eventos de perda de massa, tanto para as membranas produzidas por *K. hansenii* quando por *K. rhaeticus*, como pode ser observado das Figuras 10, 11 e 12. Desses eventos o primeiro está associado com a perda de moléculas de água na superfície do material, o segundo e terceiro estão associados com a degradação térmica da celulose, estando de acordo com o processo de despolimerização e decomposição das ligações glicosídicas (De Salvi *et al.*, 2012).

Para todas as membranas produzidas a variação de perda de massa foi desprezível, sendo possível avaliar também que não restaram resíduos inorgânicos pois entre as temperaturas de 500°C e 550°C 100% da massa da membrana de CB foi perdida. Este resultado indica que o uso dos resíduos de hortifrúti como meios de cultivo, além de não alterar o comportamento térmico do polímero, não influenciou na pureza das membranas.

Figura 10 - TGA das membranas produzidas por *K. rhaeticus* nos meios de resíduos triturados. (Fonte: próprio autor)

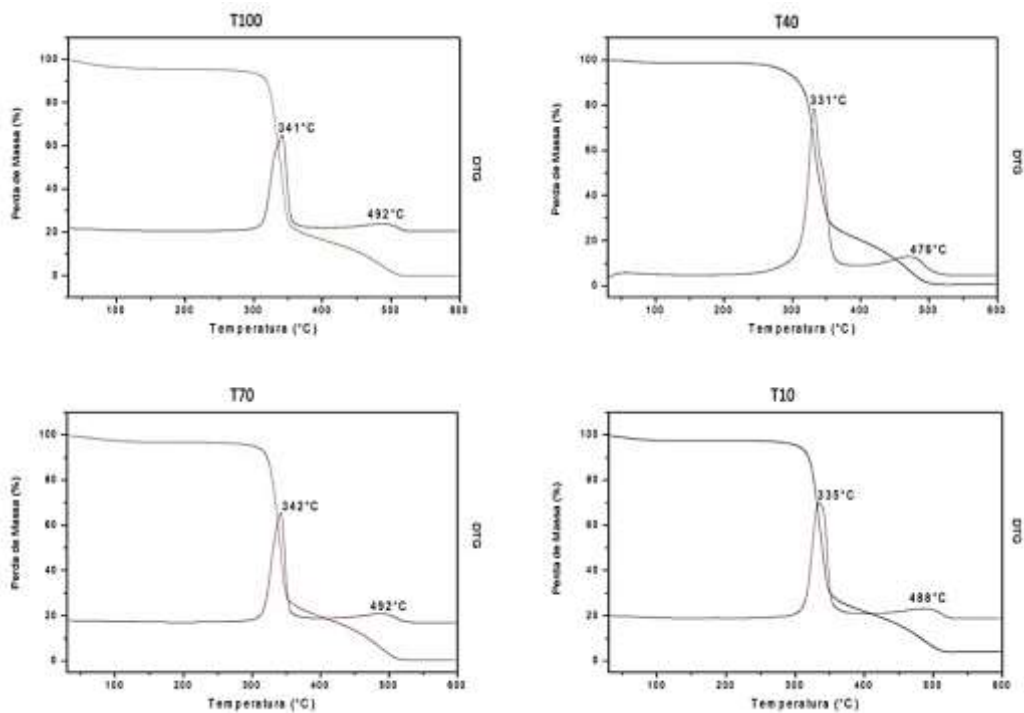


Figura 11 – TGA/DTG das membranas produzidas por *K. rhaeticus* nos meios obtidos por meio da infusão dos resíduos. (Fonte: próprio autor)

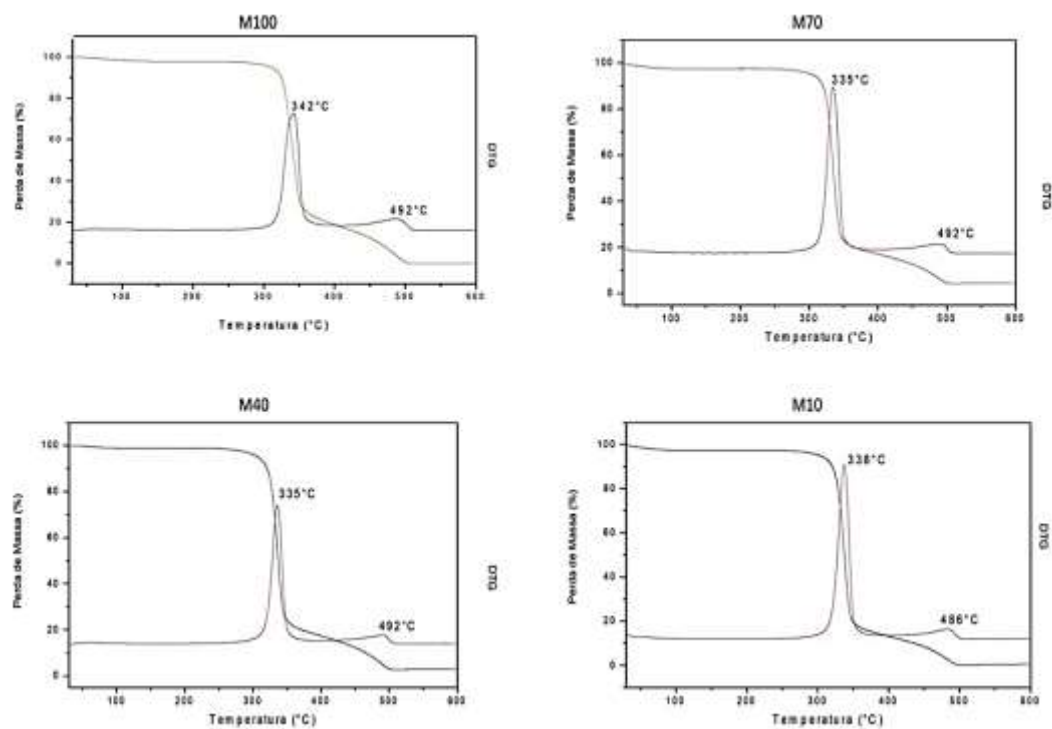
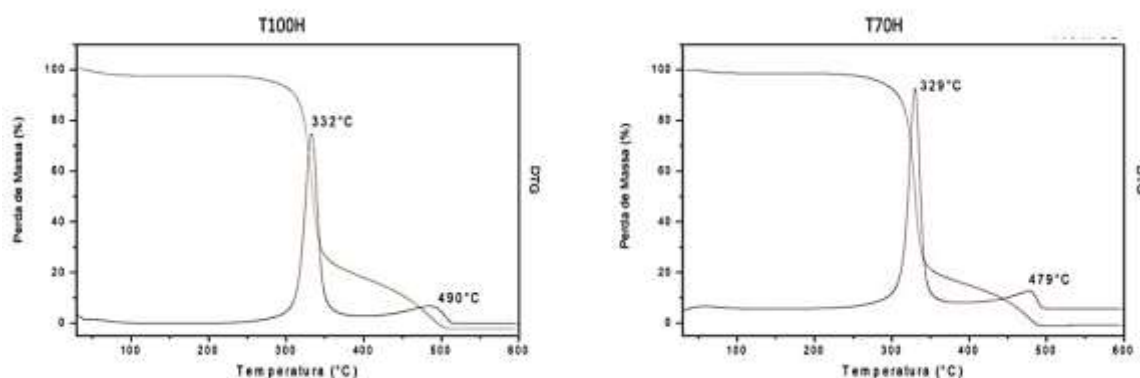


Figura 12 – TGA/DTA das membranas produzidas por *K. hansenii* nos meios com resíduos triturados. (Fonte: próprio autor)



3.4.2. Análise por FT-IR

De acordo com a literatura, as bandas no intervalo de 3350-3500 cm^{-1} de celulose pura são atribuídas ao estiramento O-H, enquanto as bandas 2800-2900 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos C-H. A banda em 1160 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-O-C, enquanto as bandas no intervalo 1035-1060 cm^{-1} são devidas ao estiramento C-O (Lazarini *et al.*, 2016). Sendo assim os espectros de FT-IR das membranas de CB exibidos nas Figuras 13, 14 e 15, confirmam a pureza das membranas de CB e reforçam os resultados obtidos pela TGA, indicando que a utilização dos resíduos não altera as propriedades químicas das membranas de CB.

Figura 13 – Espectros de FT-IR das membranas de CB produzidas por *K. rhaeticus* nos meios de resíduos de hortifrúti obtidos por meio da trituração dos resíduos (T). (Fonte: próprio autor)

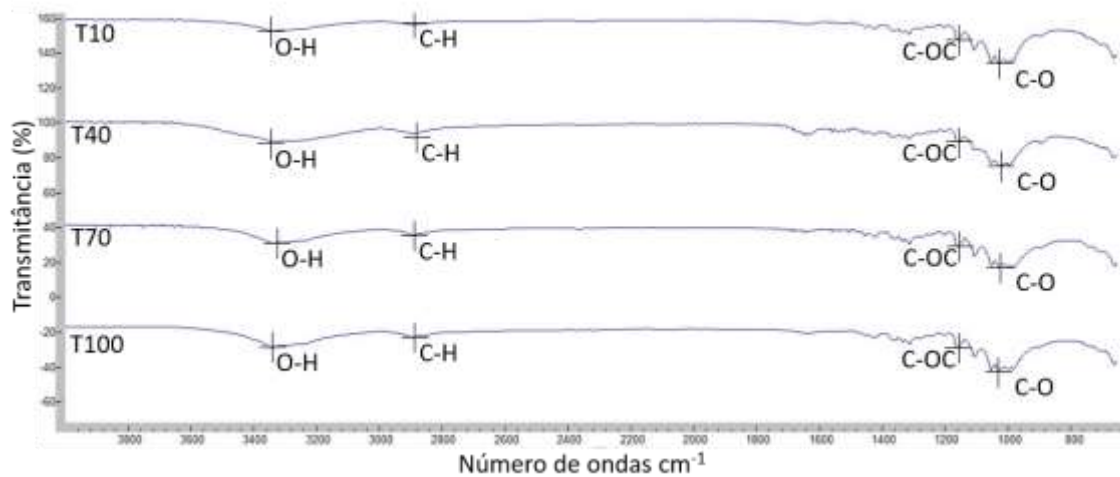


Figura 14 - Espectros de FT-IR das membranas de CB produzidas por *K. rhaeticus* nos meios de resíduos de hortifrúti obtidos por meio da infusão dos resíduos (M). (Fonte: próprio autor)

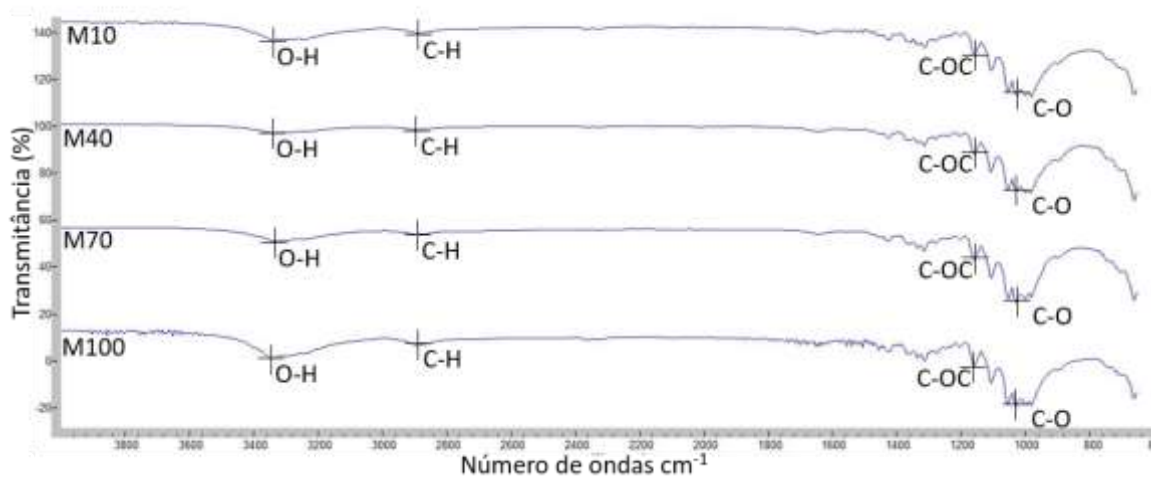
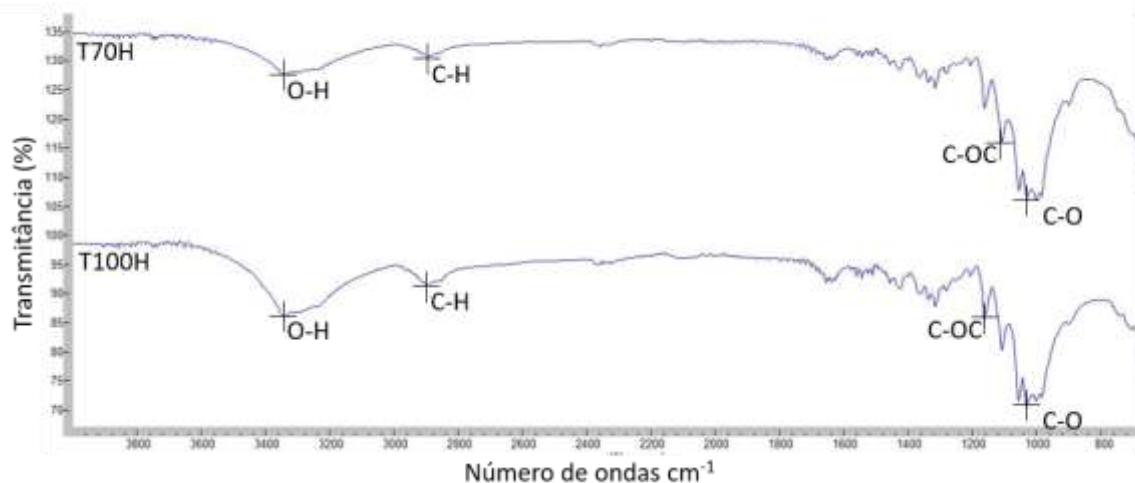


Figura 15 - Espectros de FT-IR das membranas de CB produzidas por *K. hansenii* nos meios de resíduos de hortifrúti obtidos por meio da trituração dos resíduos (T). (Fonte: próprio autor)



3.4.3. Análise por Microscopia eletrônica de varredura

A MEV permite a análise das características morfológicas relacionadas ao entrelaçamento e espessura das fibras, além de uma análise superficial da porosidade. Com relação as membranas produzidas por *K. rhaeticus* nos meios obtidos por trituração dos resíduos (Figuras 16, 17, 18 e 19), é possível observar diferenças com relação ao entrelaçamento de fibras de acordo com a concentração de resíduo no meio de cultivo, contudo a espessura das fibras não apresenta grandes diferenças entre si.

Figura 16 – MEV da membrana de CB produzida por *K. rhaeticus* no meio T10 nos aumentos de 25.000x e 50.000x. (Fonte: próprio autor)

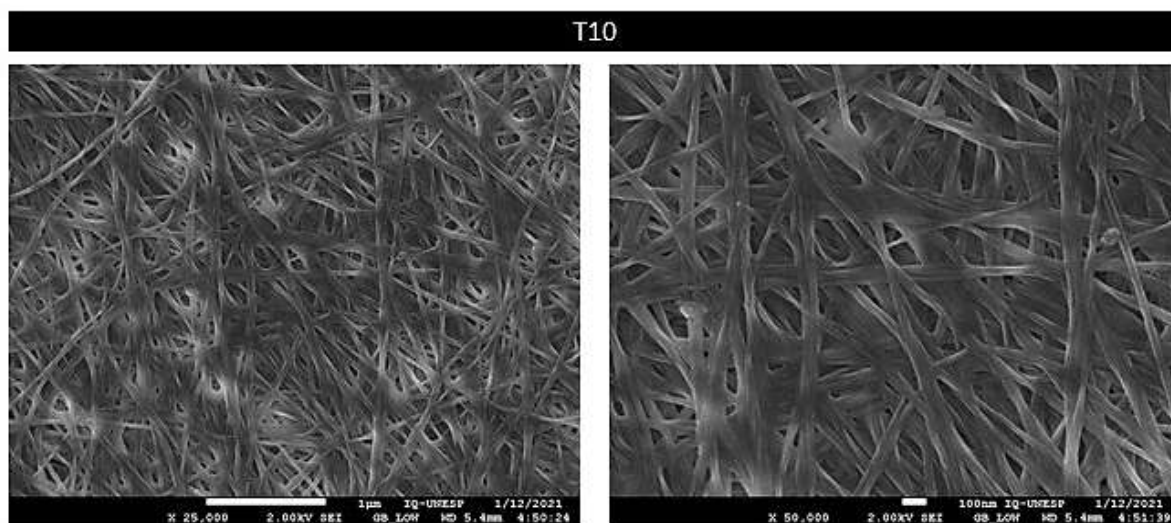


Figura 17 – MEV da membrana de CB produzida por *K. rhaeticus* no meio T40 nos aumentos de 2.000x e 50.000x. (Fonte: próprio autor)

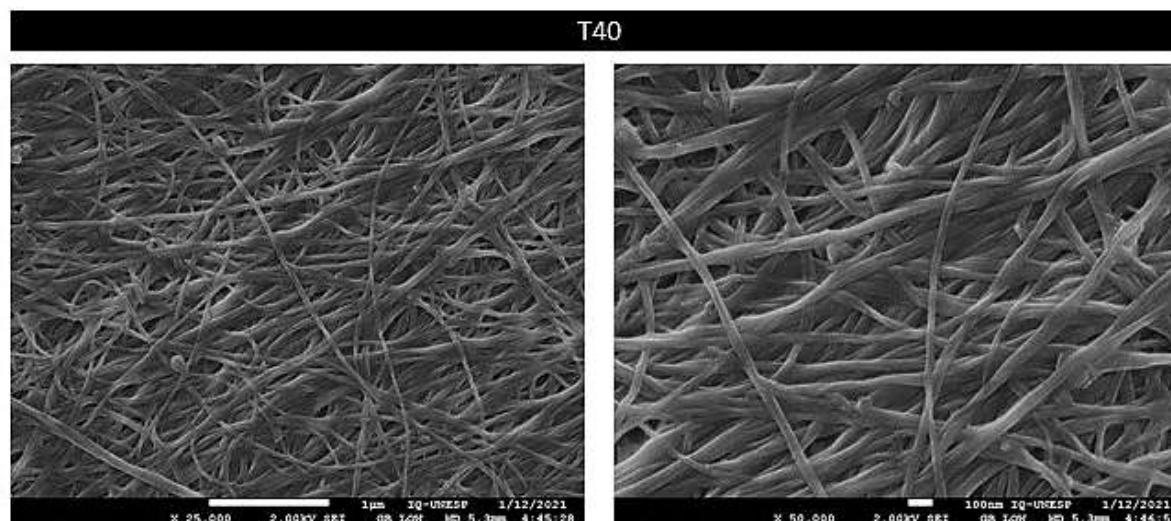


Figura 18 – MEV da membrana de CB produzida por *K. rhaeticus* no meio T70 nos aumentos de 25.000x e 50.000x. (Fonte: próprio autor)

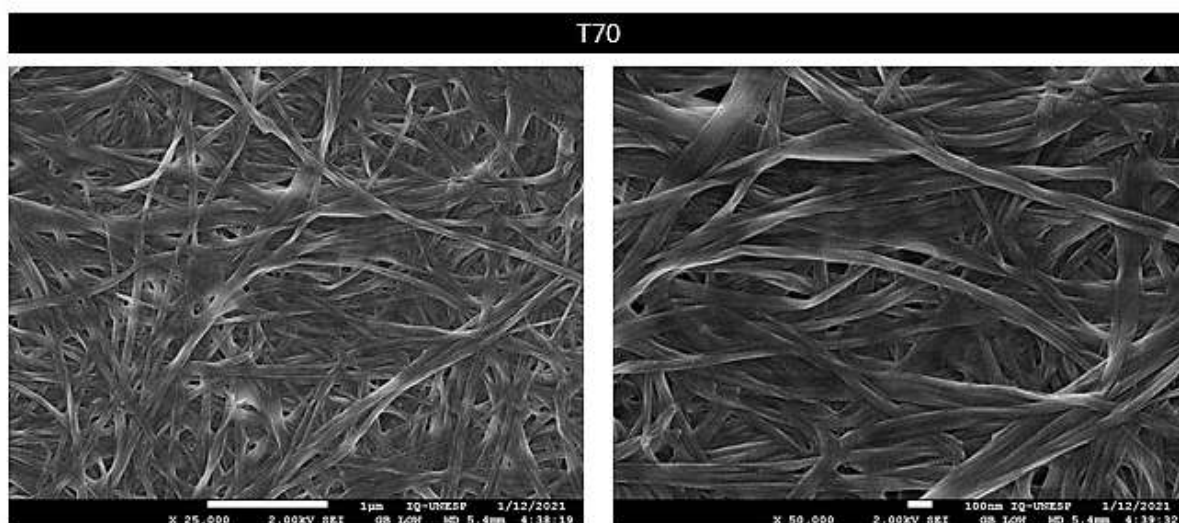
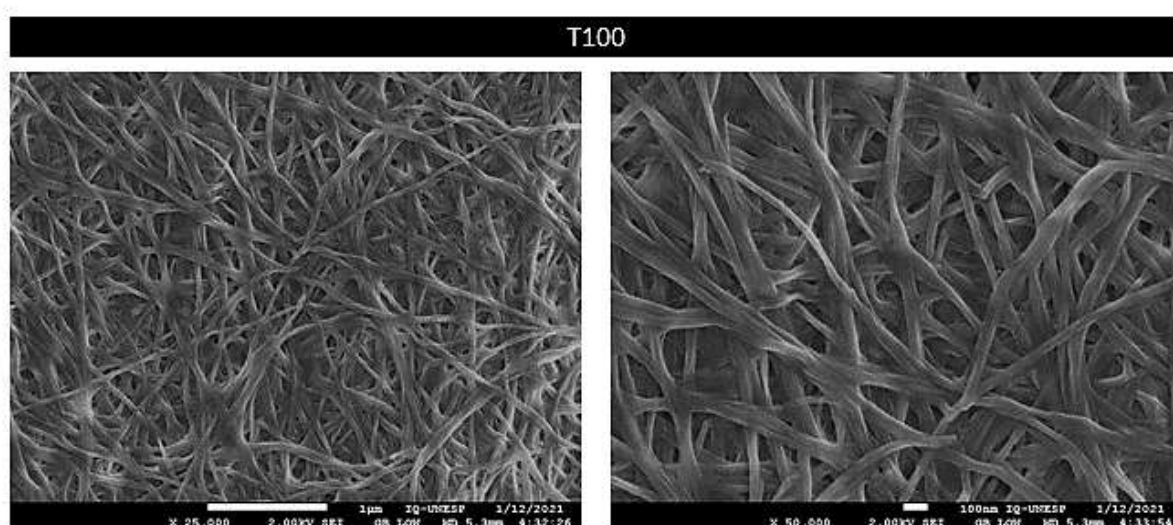


Figura 19 – MEV da membrana de CB produzida por *K. rhaeticus* no meio T100 nos aumentos de 25.000x e 50.000x. (Fonte: próprio autor)



As membranas produzidas por *K. hansenii* nos meios de resíduos triturados apresentaram morfologias diferentes de acordo com a concentração do resíduo do meio, enquanto T70H (Figura 20) apresentou um entrelaçamento de fibras com poros menos visíveis, T100H (Figura 21) apresentou um entrelaçamento de fibras com poros mais aparentes.

Figura 20 – MEV da membrana de CB produzida por *K. hansenii* no meio T70 nos aumentos de 25.000x e 50.000x. (Fonte: próprio autor)

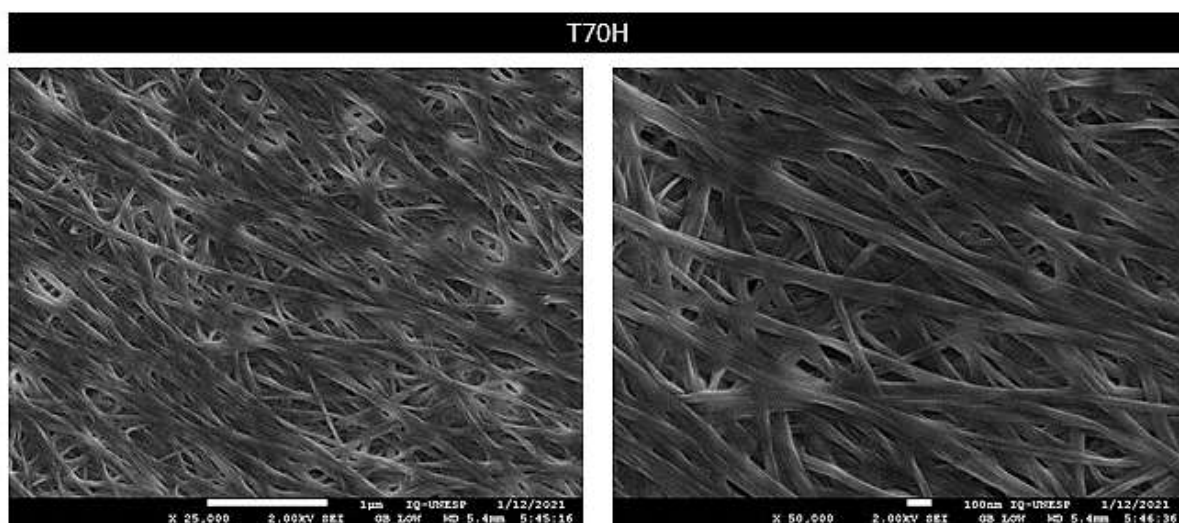
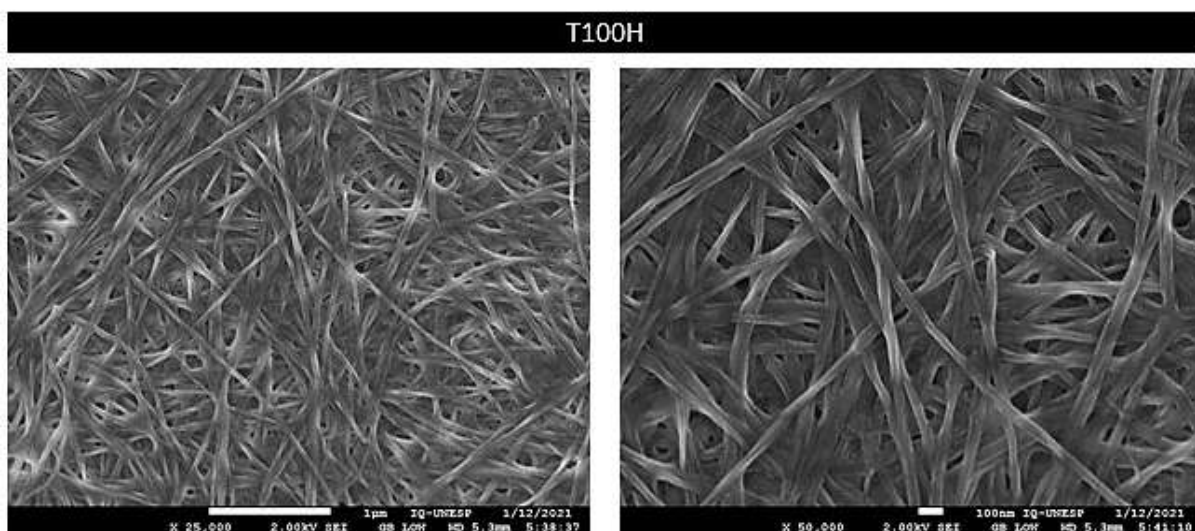


Figura 21 – MEV da membrana de CB produzida por *K. hansenii* no meio T100 nos aumentos de 25.000x e 50.000x. (Fonte: próprio autor)



Com relação as membranas produzidas por *K. rhaeticus* nos meios obtidos por meio da infusão dos resíduos, as micrografias exibidas nas Figuras 22, 23, 24 e 25 demonstram que com exceção da membrana produzida no meio M40 que apresentou um entrelaçamento de fibras mais fechado e com uma espessura maior, as demais (M10, M70 e M100) apresentaram semelhanças com relação a espessura das fibras, contudo o entrelaçamento foi diferente de acordo com o meio utilizado.

Figura 22 – MEV da membrana de CB produzida por *K. rhaeticus* no meio M10 nos aumentos de 25.000x e 50.000x. (Fonte: próprio autor)

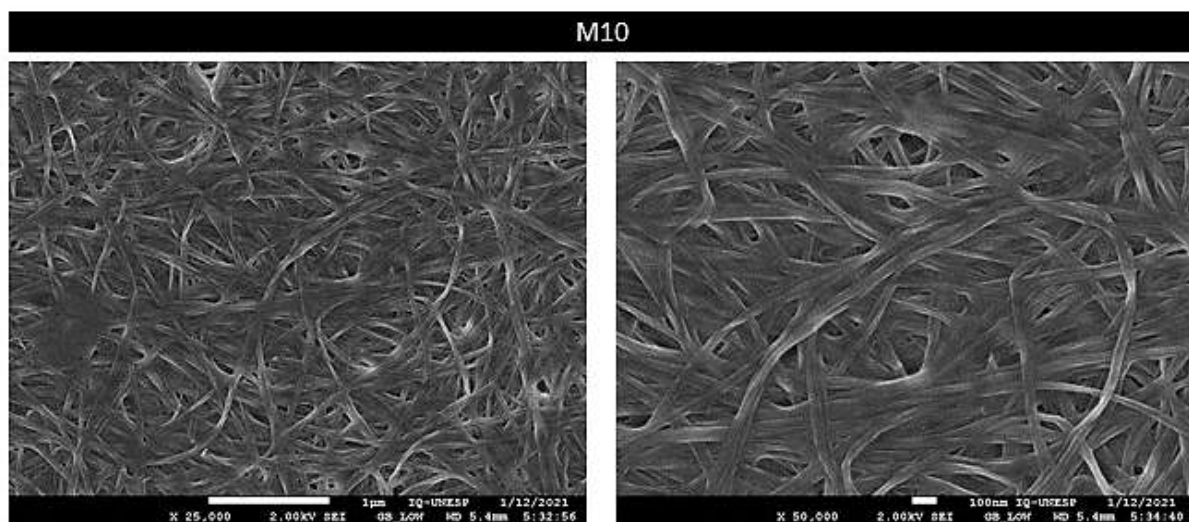


Figura 23 – MEV da membrana de CB produzida por *K. rhaeticus* no meio M40 nos aumentos de 25.000x e 50.000x. (Fonte: próprio autor)

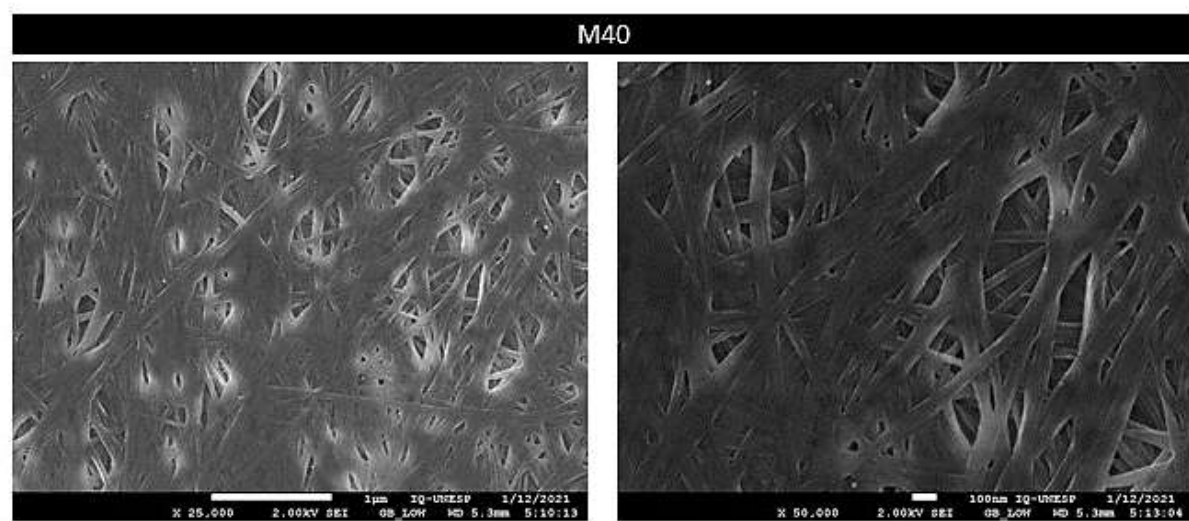


Figura 24 – MEV da membrana de CB produzida por *K. rhaeticus* no meio M70 nos aumentos de 25.000x e 50.000x. (Fonte: próprio autor)

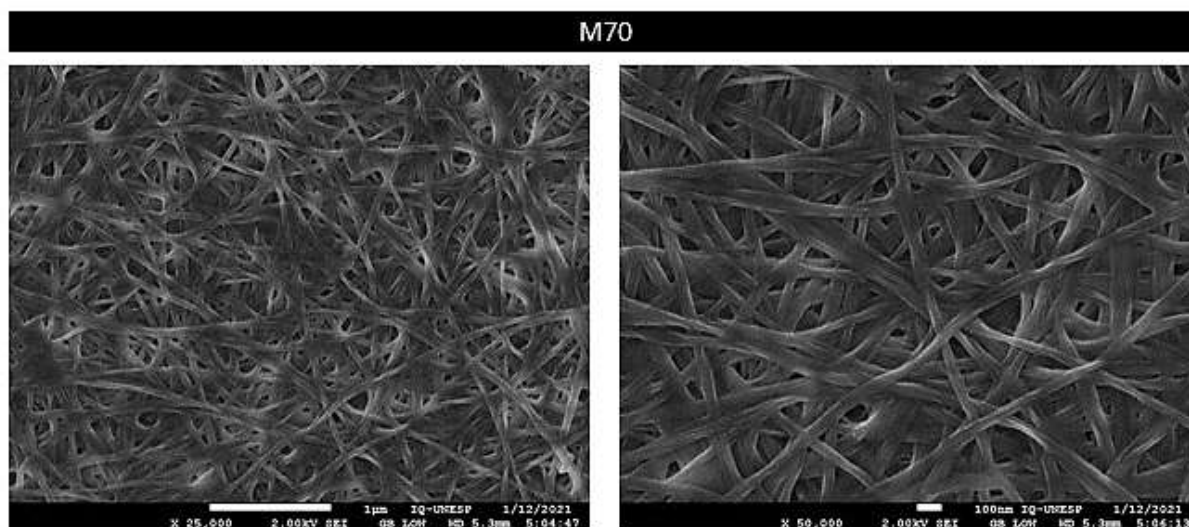
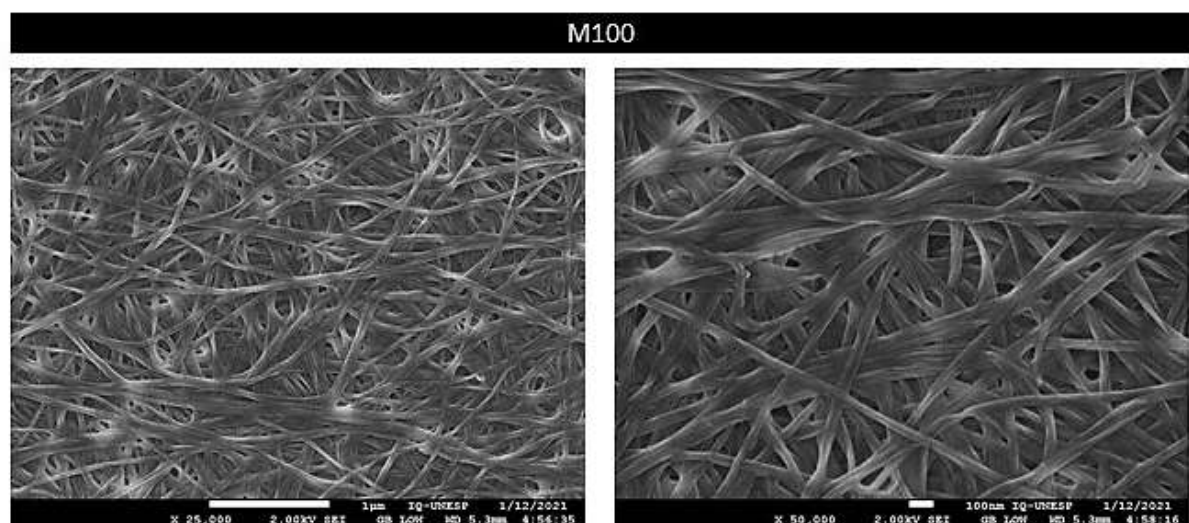


Figura 25– MEV da membrana de CB produzida por *K. rhaeticus* no meio M100 nos aumentos de 25.000x e 50.000x. (Fonte: próprio autor)



As Figuras 26 e 27 apresentam a morfologia de *K. rhaeticus* e *K. hansenii* respectivamente. Com as micrografias foi possível verificar diferenças morfológicas entre as duas espécies, *K. rhaeticus* com bacilos menores de 1,46 µm e 1,56 µm enquanto *K. hansenii* apresentou bacilos mais alongados com 2,98 µm e 4,17 µm.

Figura 26 – MEV da morfologia da bactéria *K. rhaeticus* na membrana de CB. (Fonte: próprio autor)

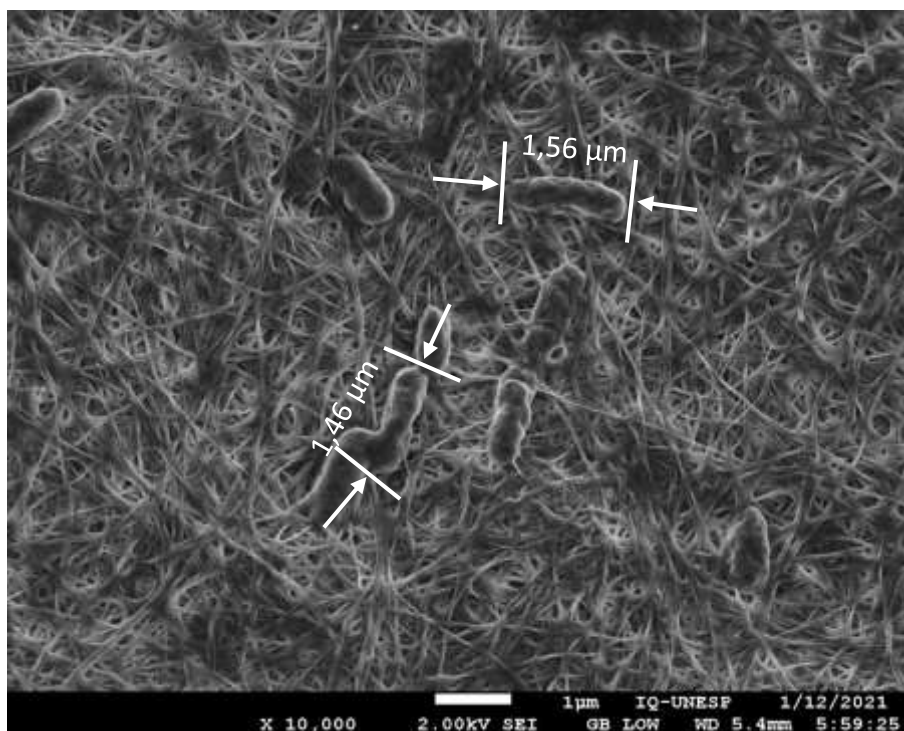
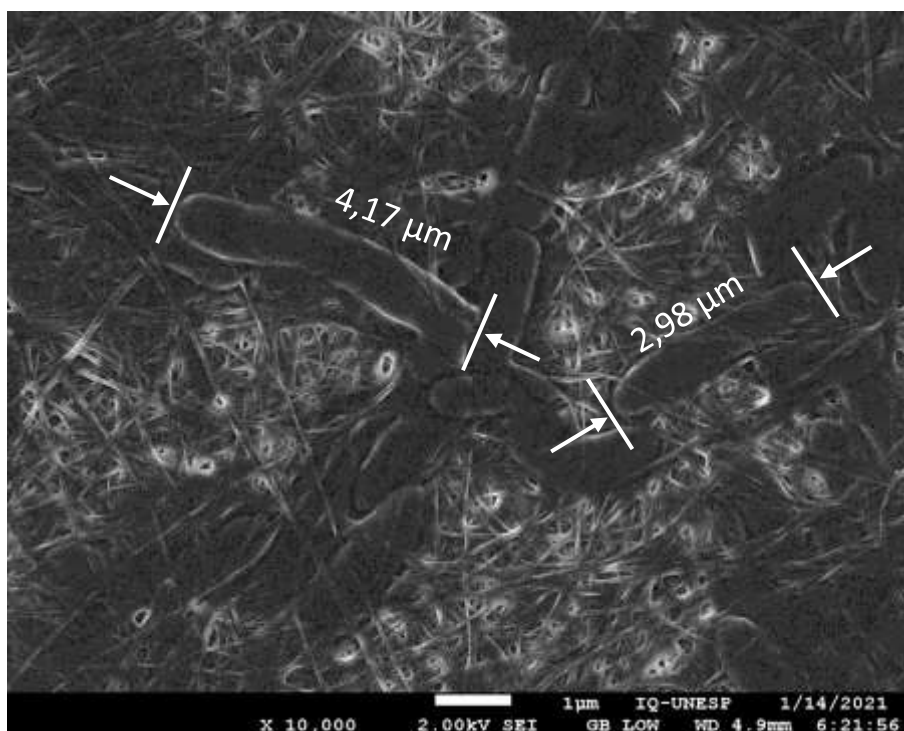


Figura 27 - MEV da morfologia da bactéria *K. hansenii* na membrana de CB. (Fonte: próprio autor)



3.5. Liberação de CRO utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti

A liberação de CRO, utilizando membranas de CB ocorreu por 24h com as membranas produzidas por *K. rhaeticus* nos meios T70, T40, T10, M100 e M40, as demais membranas produzidas nos meios T100, M70, M10 liberaram por 48h e as membranas produzidas por *K. hansenii* nos meios T100H e T70H liberaram por 48h. As Figuras 28 e 29, mostram os halos de inibição durante as 48h de liberação, a medida dos halos (em cm) é exibido na Tabela 7.

Tabela 7- Medida dos halos de inibição de crescimento bacteriano utilizando membranas de CB como suporte para a liberação de CRO

Halo de inibição (cm)										
(\pm 1mm)										
Tempo (h)	T100	T70	T40	T10	M100	M70	M40	M10	T100H	T70H
24	3,77	3,60	3,47	3,67	3,87	4,00	3,97	3,47	3,87	3,57
48	2,00	0	0	0	0	1,93	0	1,40	2,27	1,10
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lazarini e colaboradores (Lazarini *et al.*, 2016) utilizaram membranas de CB produzida no melaço de cana como suporte para a liberação de CRO, obtendo uma liberação de 8h.

Os resultados obtidos são promissores, uma vez que a CRO é uma cefalosporina de terceira geração de amplo espectro, não disponibilizada em formas farmacêuticas para utilização tópica e somente em formas farmacêuticas para administração intravenosa ou intramuscular, utilizado para o tratamento de diversos tipos de infecções como as de pele (Richards *et al.*, 1984). Uma das vantagens da administração tópica é a diminuição de efeitos adversos sistêmicos como os mais comuns referentes ao uso de CRO sendo diarreia, flebites e dores referentes as injeções intramusculares, facilitando a adesão por parte dos pacientes (Narasimha Murthy and Shivakumar, 2010; Benson and Watkinson, 2011).

3.6. Liberação de LVX utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti

A liberação de LVX utilizando membranas de CB como suporte de liberação ocorreu por 48h para todas as membranas produzidas, como exibido nas Figuras 28 e 29 e na Tabela 8.

Tabela 8- Medida dos halos de inibição de crescimento bacteriano utilizando membranas de CB como suporte para a liberação de LVX.

Halo de inibição (cm) (± 1mm)										
Tempo (h)	T100	T70	T40	T10	M100	M70	M40	M10	T100H	T70H
24	4,80	4,43	4,43	4,53	4,90	4,17	4,50	4,53	4,50	4,47
48	3,13	2,50	1,93	1,47	2,13	1,90	2,10	2,10	2,40	2,23
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Assim como CRO, LVX é um fármaco sem formulação tópica, porém sendo administrado via oral, é um antibacteriano fluoroquinolona de terceira geração e por possuir amplo espectro pode ser utilizado para o tratamento de infecções de pele (Davis and Bryson, 1994). O uso de formas farmacêuticas tópicas no tratamento de infecções de pele são, no geral, mais vantajosos uma vez que torna possível a utilização do fármaco diretamente no local infectado (Narasimha Murthy and Shivakumar, 2010; Benson and Watkinson, 2011).

O uso de membranas de CB como curativos para diversos tipos de feridas, como queimaduras e úlceras de pressão já é descrito na literatura e mostra grande potencial do uso do polímero nessa área. Embora o mecanismo ainda não seja completamente conhecido, alguns autores propõem que o arranjo tridimensional das membranas de CB mimetiza a pele, facilitando a cicatrização. Por outro lado, um mecanismo já conhecido da CB é a barreira de proteção contra infecções secundárias em feridas, porém não resolvendo se o local já estiver infectado (de Oliveira Barud *et al.*, 2016). Sendo assim, a utilização dessas membranas com fármacos torna-se de grande interesse para aplicações médicas no tratamento de infecções de pele.

3.7. Liberação de RFM utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti

A liberação de RFM utilizando membranas de CB apresentou diferenças no tempo de liberação de acordo com o meio e a cepa utilizada para a produção. Esse resultado pode estar relacionado com as diferenças de entrelaçamento de fibras que foram discutidas no item 3.4.3.

A morfologia das membranas de CB é um dos fatores que contribuem na liberação do fármaco, Lazarini e colaboradores (Lazarini, *et al.* 2016) utilizaram diferentes fontes de carbono para a produção de CB, indicando que o meio de cultivo influencia no entrelaçamento e espessura das fibras, obtendo também diferentes tempos de liberação do fármaco de acordo com a fonte de carbono utilizada.

As membranas produzidas por *K. rhaiticus* nos meios M100, M70 e M40 liberaram por 144h, T100 por 288h, T70 por 408h, T40 por 504h, M70 por 624h e T10 por 648h. As membranas produzidas por *K. hansenii* nos meios T100H e T70H liberaram por 456h e 288h respectivamente, como pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9 – Medida dos halos de inibição de crescimento bacteriano utilizando membranas de CB como suporte para a liberação de RFM

Tempo (h)	Halo de inibição (cm)									
	(± 1 mm)									
	T100	T70	T40	T10	M100	M70	M40	M10	T100H	T70H
24	4,10	4,10	4,00	4,30	4,53	4,77	4,43	4,13	4,33	4,37
48	3,33	3,17	2,80	3,10	3,17	3,40	3,17	3,00	3,17	3,37
72	3,30	3,17	2,93	3,10	3,03	3,07	3,20	3,17	3,40	3,17
96	3,07	3,40	2,23	3,03	3,17	3,17	3,37	3,20	3,30	3,37
120	2,80	2,90	2,75	2,70	2,63	2,70	2,93	3,00	3,00	3,20
144	2,50	2,87	2,55	2,50	1,97	2,43	2,30	2,83	3,00	3,23
168	2,50	2,87	2,75	2,53	0	0	0	2,77	2,80	3,20
192	2,70	2,90	2,60	2,63	0	0	0	2,97	2,73	3,10
216	2,70	2,53	2,45	2,47	0	0	0	2,87	2,63	2,87
240	2,73	3,17	2,75	2,80	0	0	0	3,27	2,80	3,17
264	2,50	3,07	2,60	2,60	0	0	0	2,87	2,50	3,07
288	2,23	2,90	2,55	2,67	0	0	0	2,87	2,83	2,33
312	0	2,83	2,40	2,57	0	0	0	2,60	2,77	0
336	0	2,63	2,45	2,40	0	0	0	2,63	2,70	0
360	0	2,83	2,30	2,40	0	0	0	2,57	2,53	0
384	0	2,63	2,25	2,47	0	0	0	2,87	2,70	0
408	0	2,53	2,40	2,57	0	0	0	2,97	2,37	0
432	0	0	2,30	2,70	0	0	0	2,77	2,27	0
456	0	0	2,15	2,33	0	0	0	2,57	1,83	0
480	0	0	2,25	2,23	0	0	0	2,50	0	0
504	0	0	1,85	2,20	0	0	0	2,33	0	0
528	0	0	0	2,47	0	0	0	2,60	0	0
552	0	0	0	2,43	0	0	0	2,53	0	0
576	0	0	0	2,53	0	0	0	2,50	0	0
600	0	0	0	2,63	0	0	0	2,47	0	0
624	0	0	0	2,33	0	0	0	2,27	0	0
648	0	0	0	2,47	0	0	0	0	0	0
672	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

As Figuras de 28 a 32 mostram a liberação no decorrer das 648h, durante o processo, que é realizado em fluxo laminar, um dos discos da triplicada de membrana T40 foi sugado durante o manuseio, sendo assim a partir de 96h T40 apresenta apenas duplicata, o incidente não inviabilizou o uso dos dados para a análise.

É possível observar que a triplicada da membrana produzida no meio T10, apresentou liberação constante até zerar no final das 648h.

A RFM é um antibacteriano utilizado principalmente no tratamento da tuberculose e hanseníase sendo administrado por via oral, não tendo, assim como LVX e CRO formulação tópica. Contudo a RFM é um derivado da Rifamicina, medicamento utilizado para infecções de pele, em formulações tópicas como o spray e pomada (Souza, 2005; Walduck *et al.*, 2020).

A RFM quando administrado via oral, apresenta diversos efeitos colaterais, entre eles a hepatotoxicidade (Souza, 2005), sendo assim de grande interesse a existência de formulações tópicas.

Figura 28– Resultados dos ensaios de liberação sustentada após 24 horas de liberação de RFM, CRO e LVX utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti. (Fonte: próprio autor)

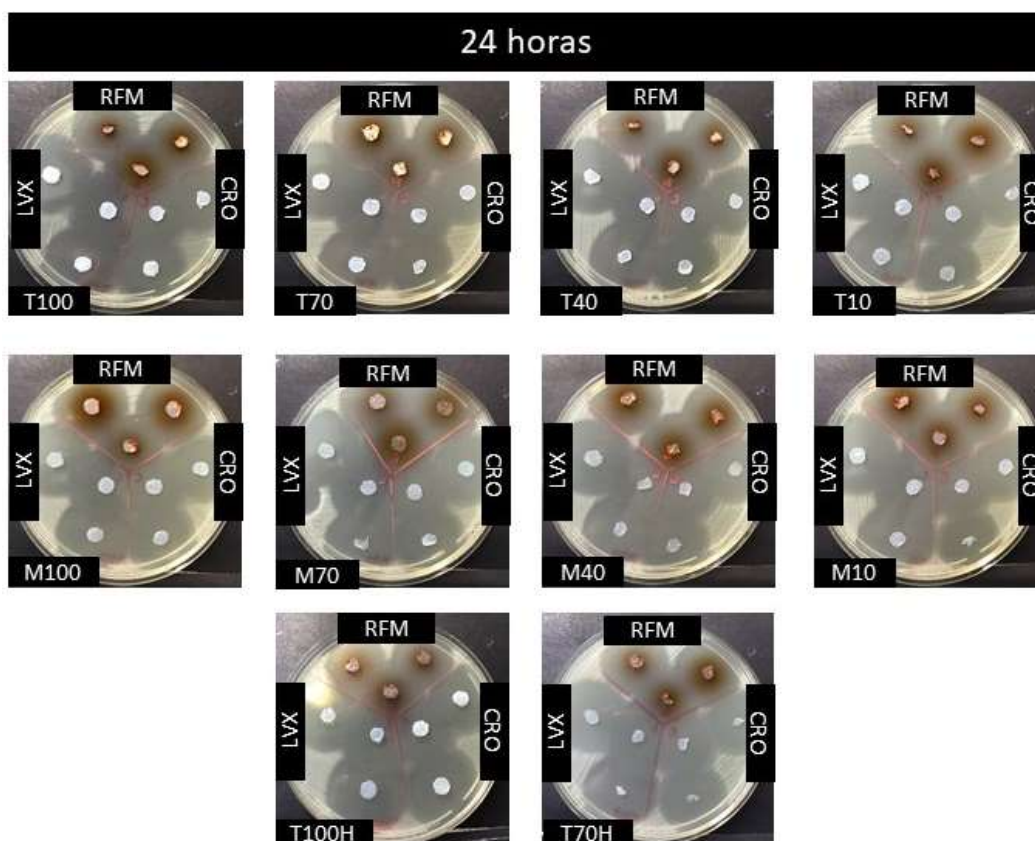


Figura 29 - Resultados dos ensaios de liberação sustentada após 48 horas de liberação de RFM, CRO e LVX utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti. (Fonte: próprio autor)

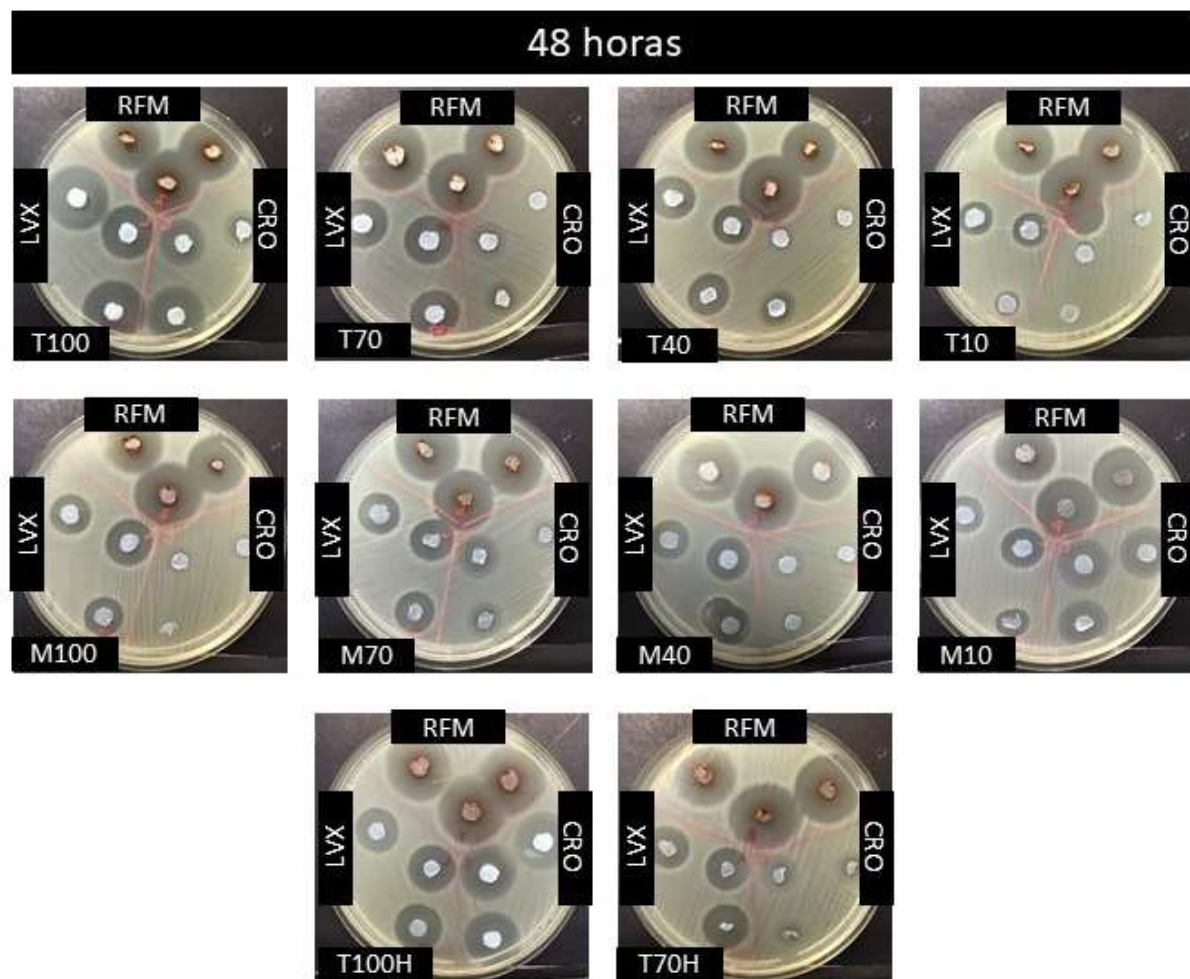


Figura 30 - Resultados dos ensaios de liberação sustentada após 72 horas de liberação de RFM, CRO e LVX utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti. (Fonte: próprio autor)

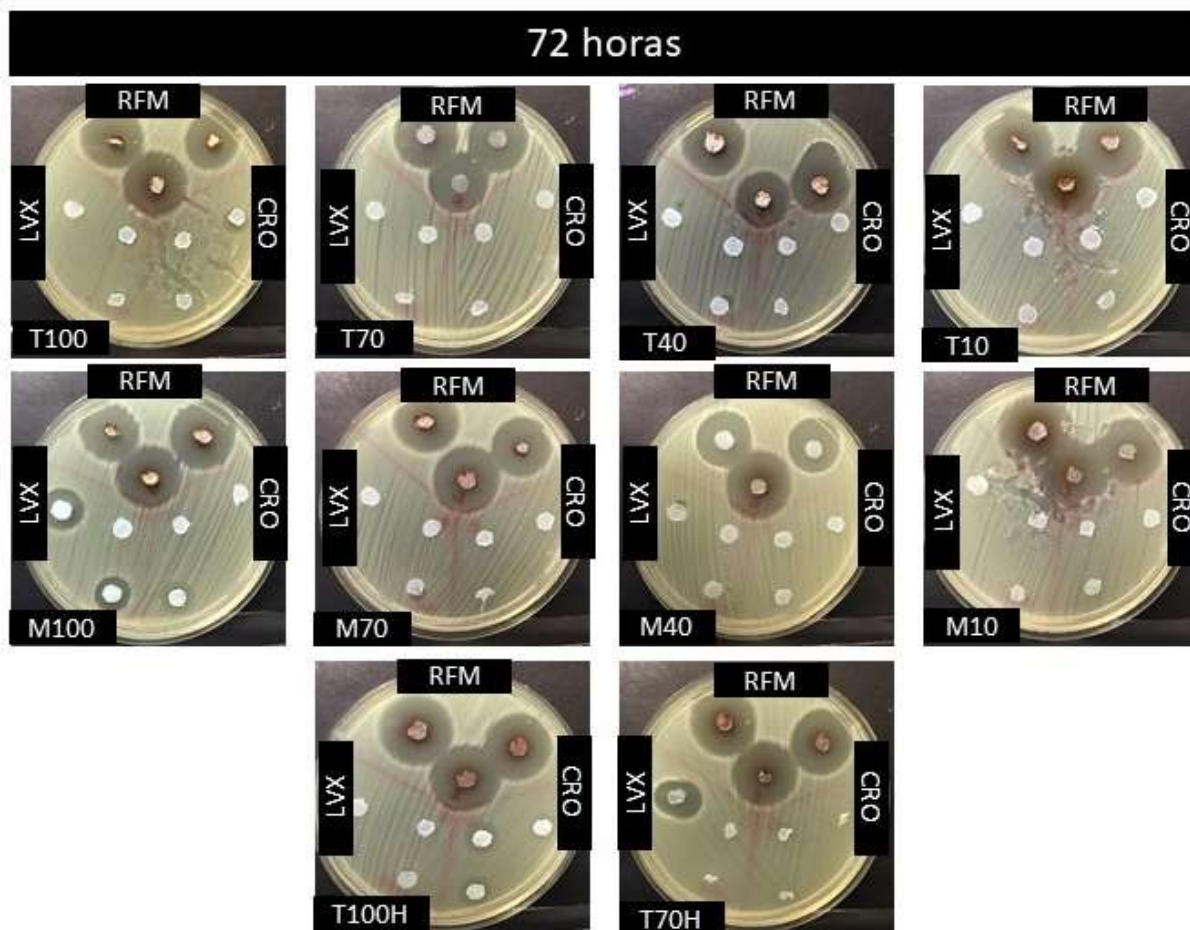


Figura 31 – Resultados dos ensaios de liberação sustentada após liberação de RFM de 96 até 192 horas utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti. (Fonte: próprio autor)

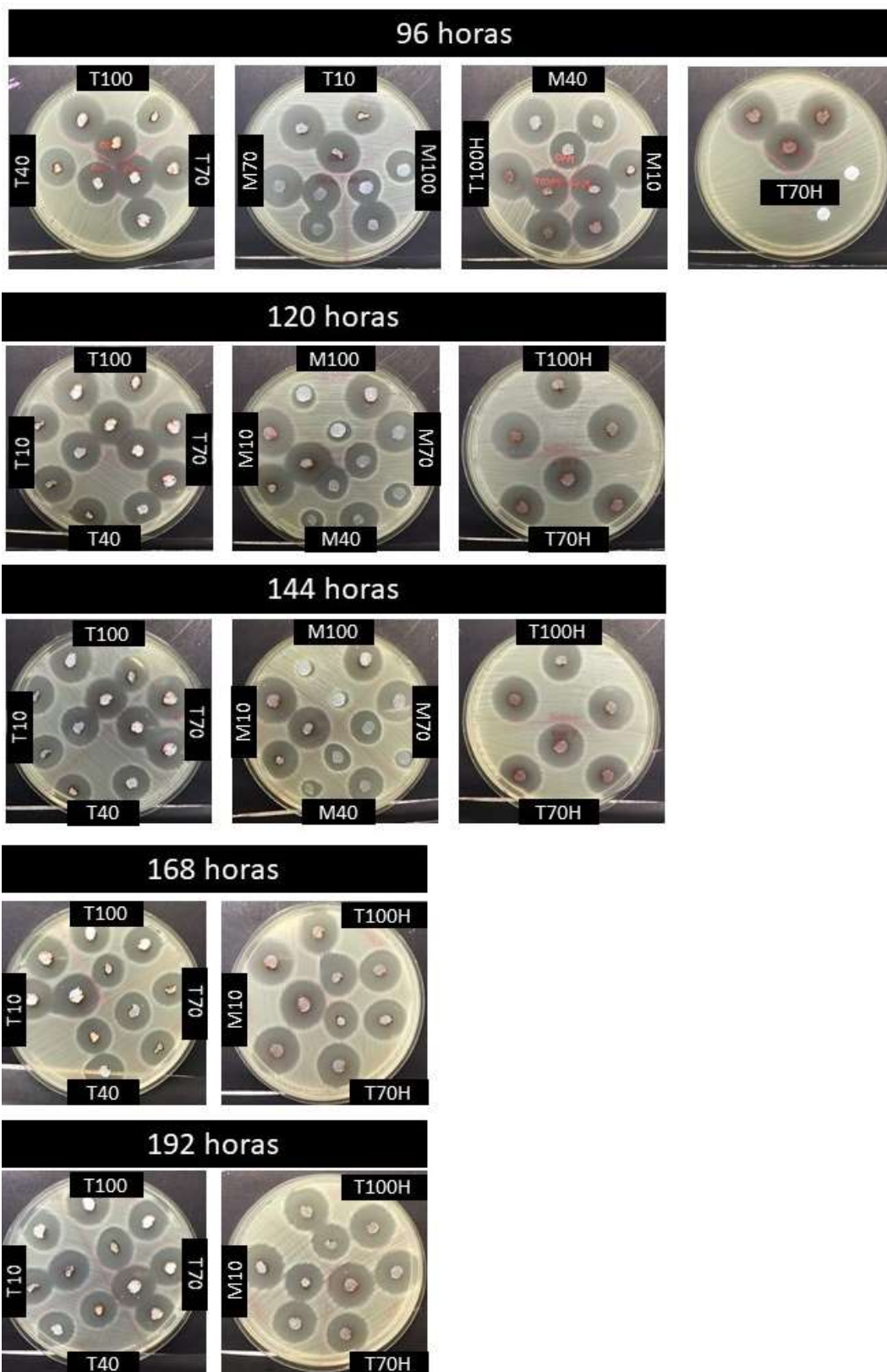


Figura 32- Resultados dos ensaios de liberação sustentada após liberação de RFM de 216 até 432 horas utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti. (Fonte: próprio autor)

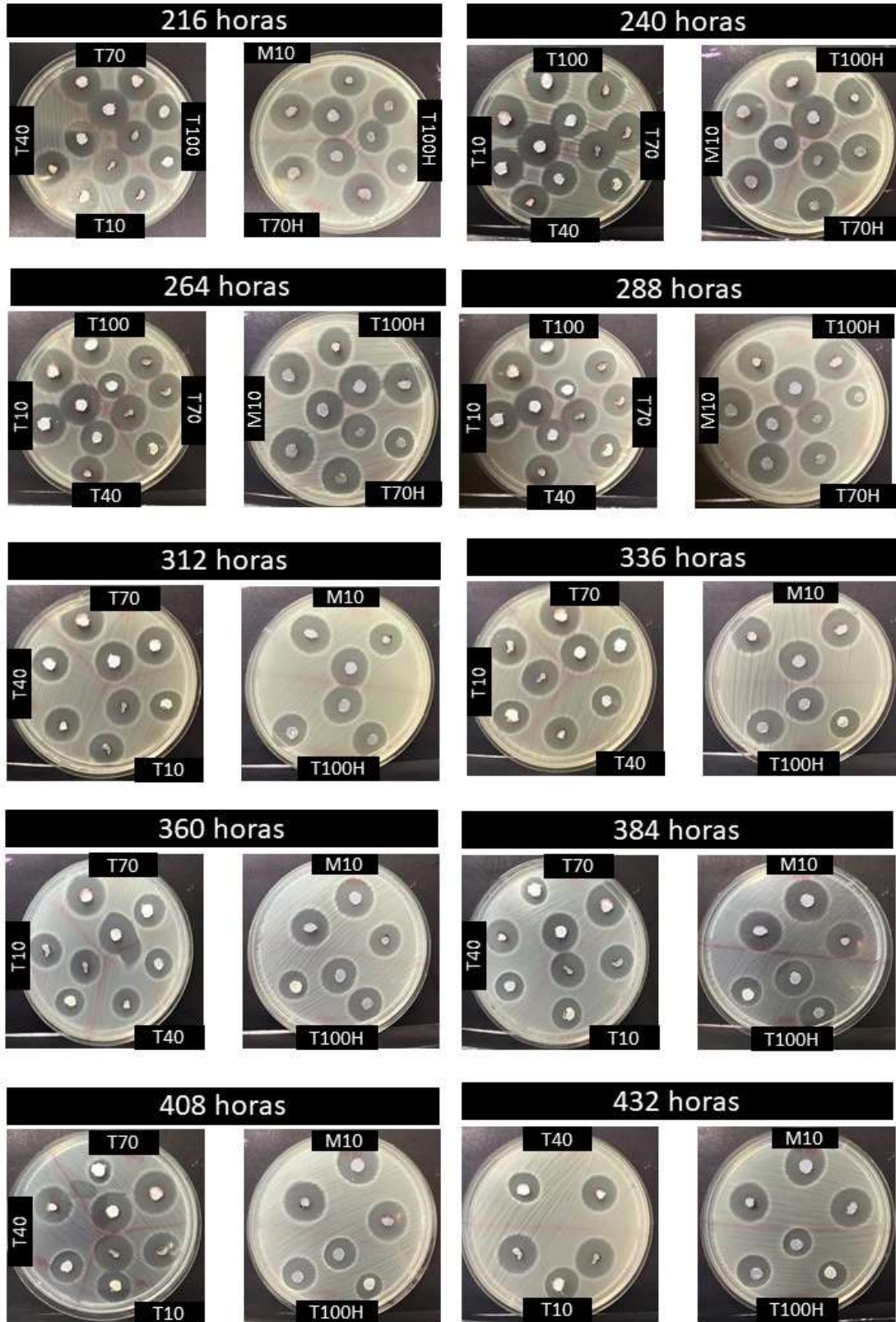
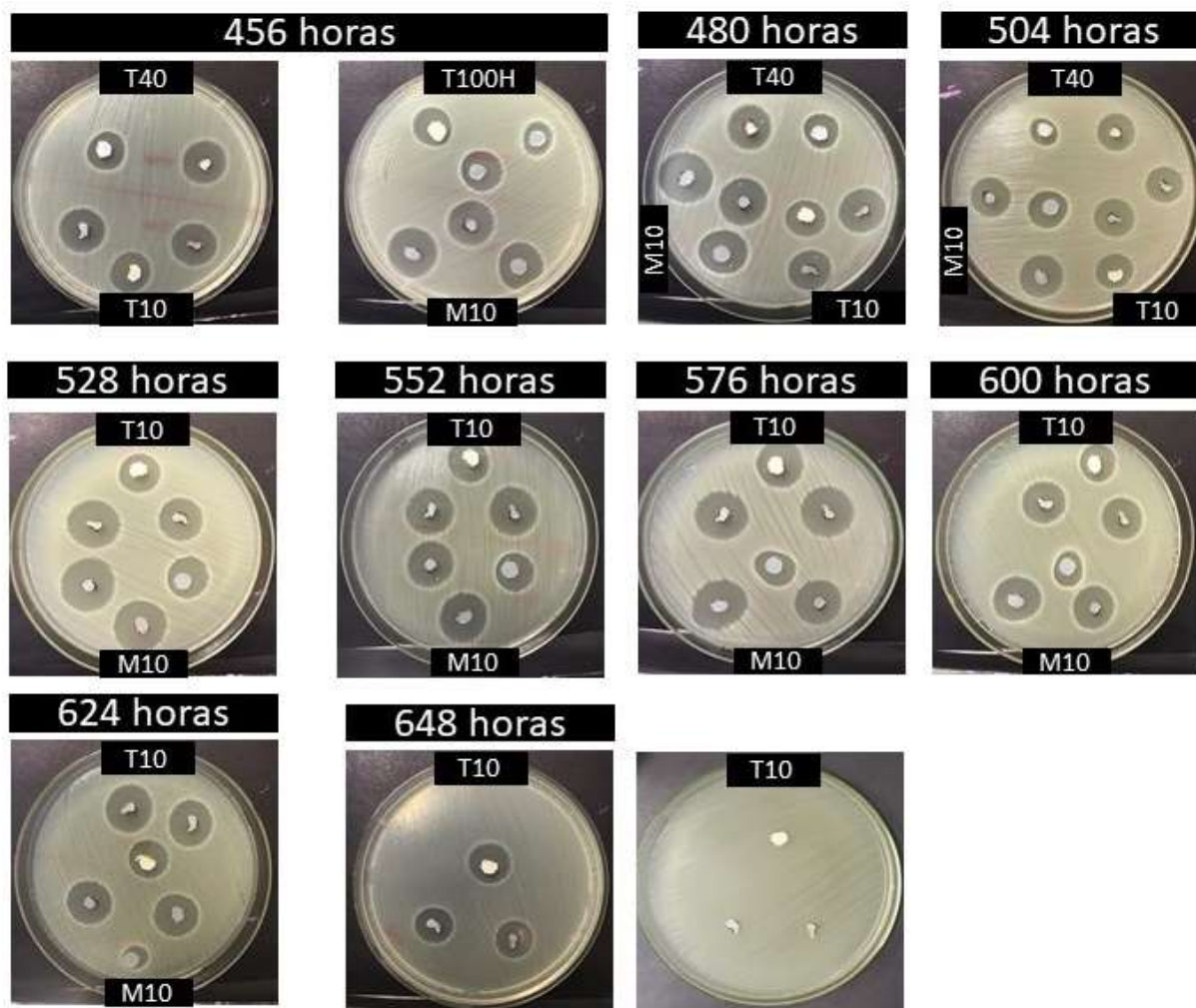


Figura 33 - Resultados dos ensaios de liberação sustentada após liberação de RFM de 456 até 648 horas utilizando membranas de CB produzidas nos meios de resíduos de hortifrúti. (Fonte: próprio autor)



A membrana de CB é amplamente descrita na literatura para utilização na cicatrização de feridas e como suporte de liberação de fármacos e outras moléculas bioativas, contudo a obtenção de uma membrana de CB com baixo custo de produção a partir do aproveitamento de resíduos de hortifrúti com alta capacidade de retenção e liberação, tornam os resultados obtidos promissores.

As formas farmacêuticas de tratamento tópica são no geral pomadas, cremes, géis, sprays e soluções, contudo, a utilização desses produtos necessitam de aplicações periódicas, como no exemplo dos medicamentos que contém rifamicina, Rifocina ® Spray (Sanofi and Anvisa) e Rifocort ® creme (Medley and Anvisa) que necessitam ser aplicados, como descrito na bula, a cada 6h-8h ou a

critério médico na região infectada. Os resultados aqui apresentados demonstram que as membranas de CB apresentam grande potencial para utilização como suporte de liberação sustentada da RFM, fármaco que apresenta o mesmo mecanismo molecular de ação da rifamicina (inibição das enzimas DNA girase e topoisomerase IV bacterianas), diminuindo a necessidade de várias aplicações diárias, trazendo mais conforto para o paciente, além do fato de a RFM não ser disponibilizada em formas farmacêuticas para uso tópico.

Outro ponto a ser considerado, já discutido anteriormente neste Capítulo, é a possibilidade de utilização de fármacos que não apresentam formulações tópicas disponíveis mesmo apresentando atividade contra as bactérias que causam infecções na pele.

Sendo assim, a possibilidade de produção de dispositivos de liberação que unem a atividade da CB na cicatrização de feridas juntamente com a atividade de fármacos, reforçam a importância dos resultados obtidos no presente trabalho.

Capítulo 2

1. Metodologia

1.2. Aplicação de pressões seletivas em cultivo de *K. rhaeticus* AF-1

A aplicação das pressões seletivas química e físicas foram realizadas como descrito por Lazarini, 2018 (Lazarini *et al.*, 2018). Inicialmente foi realizado a partir do pré-inóculo descrito no item 2.3. do capítulo 1, em placa de ágar FRU um isolamento de *K. rhaeticus* e mantido em B.O.D. a 28°C por 7 dias. Após o crescimento de colônias isoladas, uma única UFC foi utilizada para realização de um aumento de massa, espalhando com a ajuda de um *swab* estéril a colônia bacteriana por toda a placa de ágar FRU, esse cultivo foi mantido em incubadora B.O.D. por 7 dias. Decorrido os 7 dias, esse aumento de massa foi utilizado para a realização dos diferentes cultivos para a aplicação das pressões seletivas química e físicas.

1.2.1. Exposição a luz UV

Para a aplicação dos diferentes tempos de exposição a luz UV, foi realizado um isolamento por esgotamento utilizando alça bacteriológica em placas de ágar FRU, a seguir, as placas foram expostas a luz UV em um Transluminador UV 312 nm modelo K33-312A – Kasvi por 10, 15 e 30 minutos.

Decorrido o tempo de exposição as placas foram retiradas e mantidas em B.O.D. a 28°C por 7 dias.

1.2.2. Diferentes temperaturas

Como descrito no item anterior, foi realizado um isolamento por esgotamento utilizando alça bacteriológica em placas de ágar FRU, os cultivos foram mantidos por 24h, nas temperaturas de 20°C, 25°C e 35°C.

Decorrido as 24h, as placas foram retiradas das diferentes temperaturas e mantidas em B.O.D. a 28°C por 7 dias.

1.2.3. Diferentes valores de pH

Para o cultivo em diferentes valores de pH a bactéria foi inoculada em tubos de ensaio contendo 10mL de meio FRU líquido com pH nos valores de 3,5, 7 e 10. Para o ajuste dos diferentes valores de pH foram utilizados ácido acético glacial para acidificação e uma solução de KOH 2M para alcalinização. Os cultivos foram realizados todos na escala 0,5 de MacFarland e mantidos por 24h em incubadora B.O.D. a 28°C. Decorridas 24h, os tubos foram vortexados em Vorter Mixer K45-2819 – Kasvi por 30 segundos e realizado um isolamento por esgotamento utilizando alça bacteriológica em placas de ágar FRU (pH 4,5) as placas foram então mantidas em incubadora B.O.D. a 28°C por 7 dias

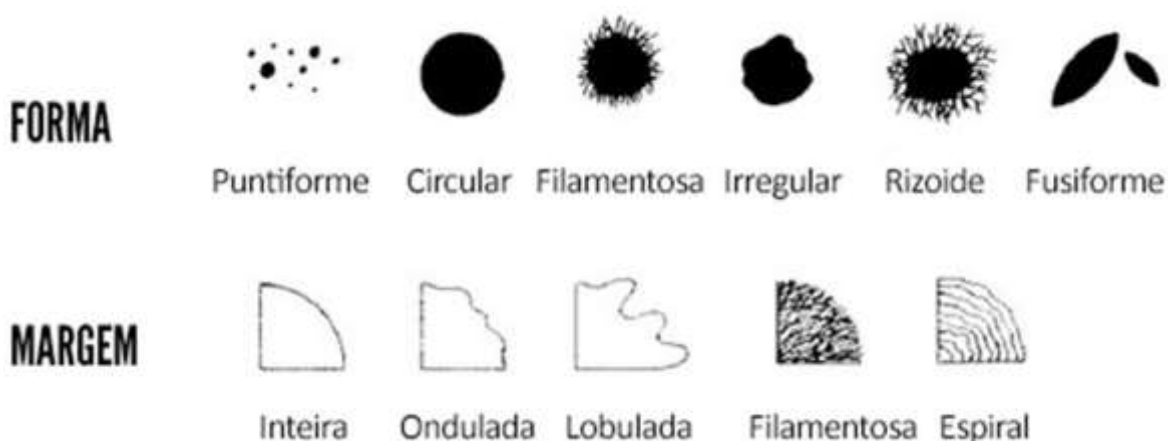
1.2.4. Pressão osmótica

Em tubos ensaio com 10mL de meio FRU líquido nas concentrações de 0,9%, 1%, 5% e 10% de NaCl os cultivos foram realizados na escala 0,5 de MacFarland e mantidos por 24h em incubadora B.O.D. a 28°C. Decorrido as 24h, os tubos foram vortexados em Vorter Mixer K45-2819 – Kasvi por 30 segundos e realizado um isolamento por esgotamento utilizando alça bacteriológica em placas de ágar FRU, as placas foram então mantidas em incubadora B.O.D. a 28°C por 7 dias.

1.3. Seleção de colônias após aplicação das pressões seletivas química e físicas

Após a aplicação das diferentes pressões química e físicas, os cultivos foram mantidos em incubadora B.O.D. a 28 °C por 7 dias. Decorrido os 7 dias, as placas foram analisadas inicialmente para verificar se houve ou não crescimento bacteriano. Os cultivos que apresentaram crescimento de colônias isoladas, foram analisados quanto a suas características macroscópicas (Figura 34), forma (puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide e fusiforme), margem (inteira, ondulada, lobulada, filamentosa e espiral) e cor. As colônias que apresentaram diferentes características macroscópicas foram utilizadas para a análise de produção de CB.

Figura 34 – Aspectos morfológicos relacionados a forma e margem das UFC avaliados para a seleção de cepas variantes após a aplicação das pressões seletivas em cultivos de *K. rhaeticus*. (Adaptado de American Society for Microbiology - Disponível em <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3136>)



1.4. Produção de CB utilizando as colônias obtidas após a aplicação das pressões seletivas química e físicas

Para cada colônia selecionada foi então realizado um aumento de massa em placa de ágar FRU, esse aumento de massa foi realizado espalhando a colônia com a ajuda de um *swab* estéril sobre o Ágar FRU, esse cultivo foi mantido em incubadora B.O.D. a 28°C por 7 dias. Decorrido os 7 dias o aumento de massa foi retirado da placa de ágar por meio de raspagem com o auxílio de uma alça bacteriológica e colocado em meio FRU líquido e então agitado vigorosamente em Vorter Mixer K45-2819 – Kasvi por 1 minuto, após esse procedimento a suspensão bacteriana obtida foi utilizada como pré-inóculo. Os cultivos foram inicialmente realizados em tubos de ensaio com 10 mL de meio FRU líquido e mantido em incubadora B.O.D. por 7 dias. Após os 7 dias os cultivos foram retirados e analisados para identificar se houve ou não produção de CB.

Os cultivos que apresentaram produção de CB foram então refeitos em triplicata utilizando um volume de 40 mL de meio FRU líquido e 10 mL do pré-inóculo e ajustados para a escala 0,5 de MacFarland, sendo mantidos em incubadora B.O.D. a 28°C por 7 dias. Decorrido os 7 dias, as membranas foram processadas e secas.

1.5. Processamento das membranas das membranas produzidas após a aplicação das pressões seletivas química e físicas

O processamento das membranas produzidas após a aplicação das pressões seletivas foi realizado como descrito no item 2.5 do Capítulo 1.

1.6. Análise de *Rms* das membranas produzidas após a aplicação das pressões seletivas

A análise do *Rms* das membranas produzidas após a aplicação das pressões seletivas foi realizada como descrito no item 2.6 do Capítulo 1.

1.7. Análise de intumescimento das membranas produzidas após a aplicação das pressões seletivas

A análise do intumescimento das membranas produzidas após a aplicação das pressões seletivas foi realizada como descrito no item 2.7 do Capítulo 1.

1.8. Caracterização físico-química das membranas produzidas após a aplicação das pressões seletivas

As membranas de CB foram caracterizadas por FT-IR e MEV, como descrito no item 2.8. do Capítulo 1.

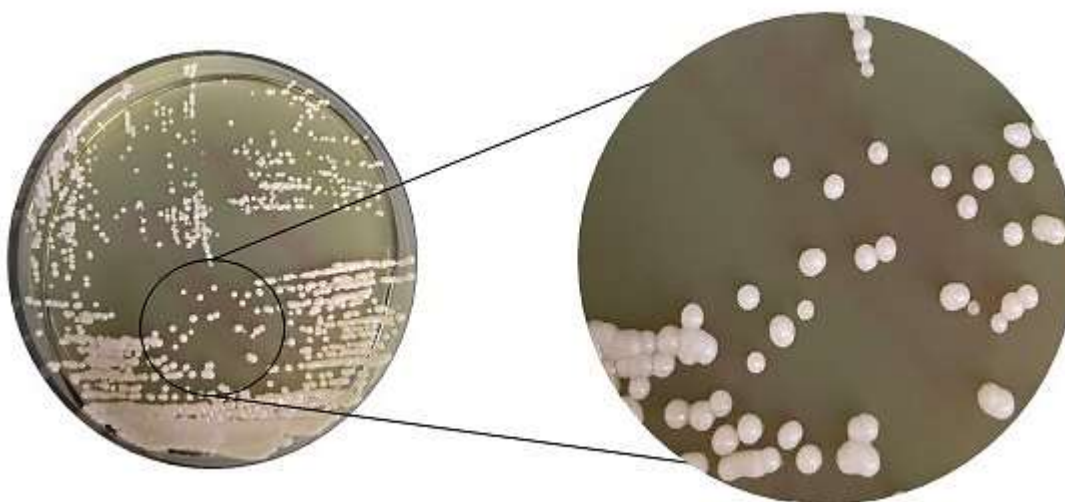
2. Resultados

2.1. Seleção de colônias de *K. rhaeticus* com características morfológicas diferentes

Foi testada a influência de pressões seletivas química (pH) e físicas (temperatura, exposição à UV e pressão osmótica), com o objetivo de selecionar variedades de *K. rhaeticus* a partir da espécie original que apresentasse maior rendimento de produção de CB. A Figura 35 mostra um cultivo com as características macroscópicas típicas das colônias de *K. rhaeticus* AF-1 isoladas em ágar FRU, demonstrando a pureza do cultivo. As colônias apresentam cor branca, com forma circular e margem inteira, apresentando dois tamanhos de colônias.

Após a aplicação das pressões seletivas, foram selecionadas 22 colônias com aspectos morfológicos diferentes da cepa original. Os resultados sugerem o desenvolvimento de variantes fenotípicas de *K. rhaeticus* original tendo em vista que o pré-inóculo utilizado para os testes de aplicação das pressões seletivas foi o mesmo.

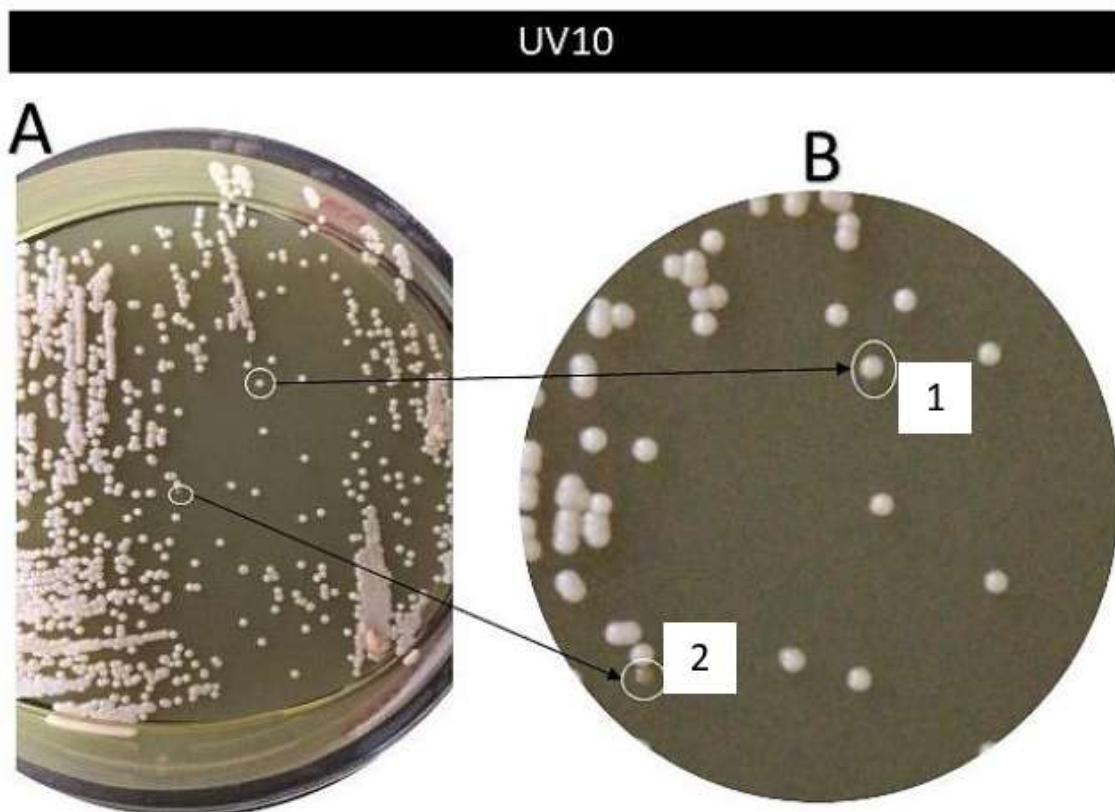
Figura 35 – Aspecto macroscópico das colônias de *K. rhaeticus* antes da aplicação das pressões seletivas. (Fonte: Próprio autor)



A Figura 36 mostra o aspecto morfológico das colônias selecionadas após a exposição a luz UV por 10 minutos, a colônia 1 apresenta cor branca, com margem

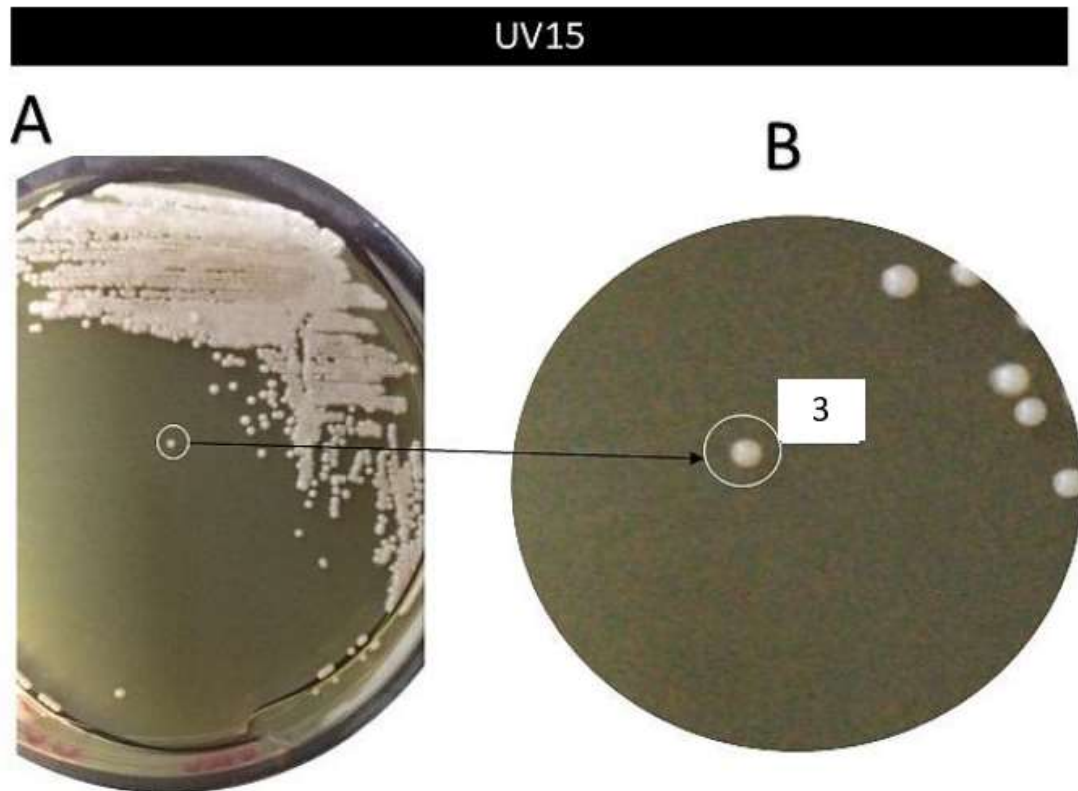
inteira e forma circular, características semelhantes as colônias da cepa original de *K. rhaeticus* AF-1 porém apresentou um tamanho menor quando comparado com as do cultivo original. A colônia 2 apresentou cor marrom clara, forma circular e margem inteira.

Figura 36 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após a exposição a luz UV por 10 minutos. Painel A tamanho original das colônias – Painel B colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas. (Fonte: Próprio autor)



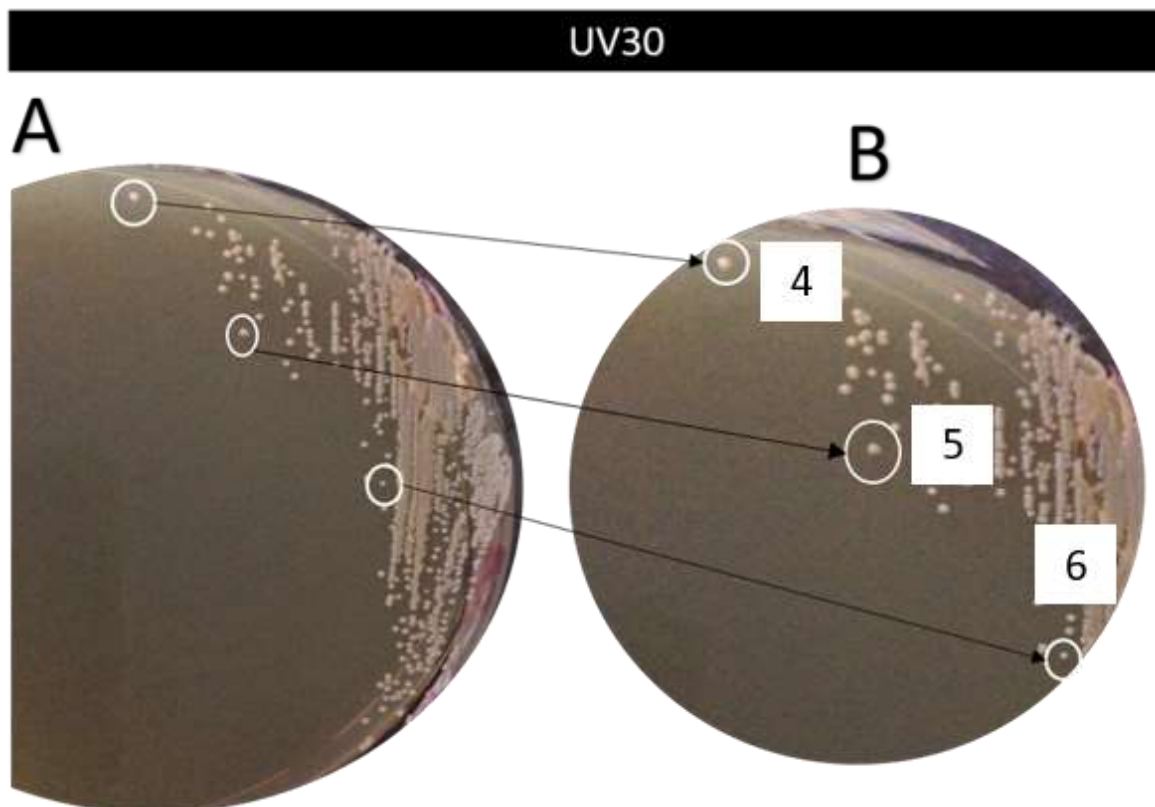
Na Figura 37 estão os aspectos macroscópicos das colônias obtidas após a exposição a luz UV por 15 minutos, sendo selecionada uma única colônia (3) que apresentou cor branca, forma circular e margem inteira.

Figura 37 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após a exposição a luz UV por 15 minutos. Painel A tamanho original das colônias – Painel B colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas. (Fonte: Próprio autor)



Na Figura 38 estão as colônias obtidas após a exposição a luz UV por 30 minutos, as colônias apresentaram mesma forma e margem apresentando, porém, diferentes tamanhos, sendo a 4 maior que 5 e 6.

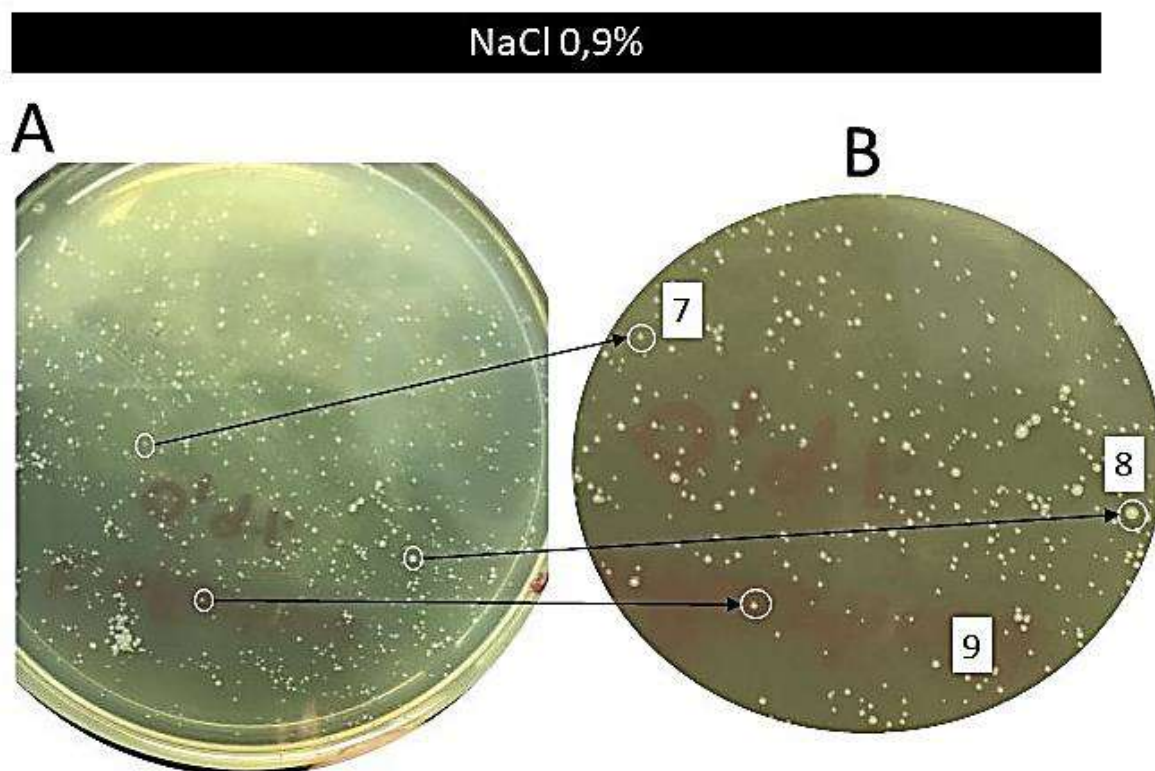
Figura 38 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após cultivo de bactérias expostas a luz UV por 30 minutos. Painel A tamanho original das colônias – Painel B colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas. (Fonte: Próprio autor)



A Figura 39 exibe as colônias selecionadas dos cultivos com concentração de 0,9% de NaCl. As colônias apresentaram tamanhos menores se comparadas com o cultivo original. As colônias 7,8 e 9 apresentaram forma circular e margem inteira, com diferenças na elevação, porém não sendo possível analisar nas Figuras.

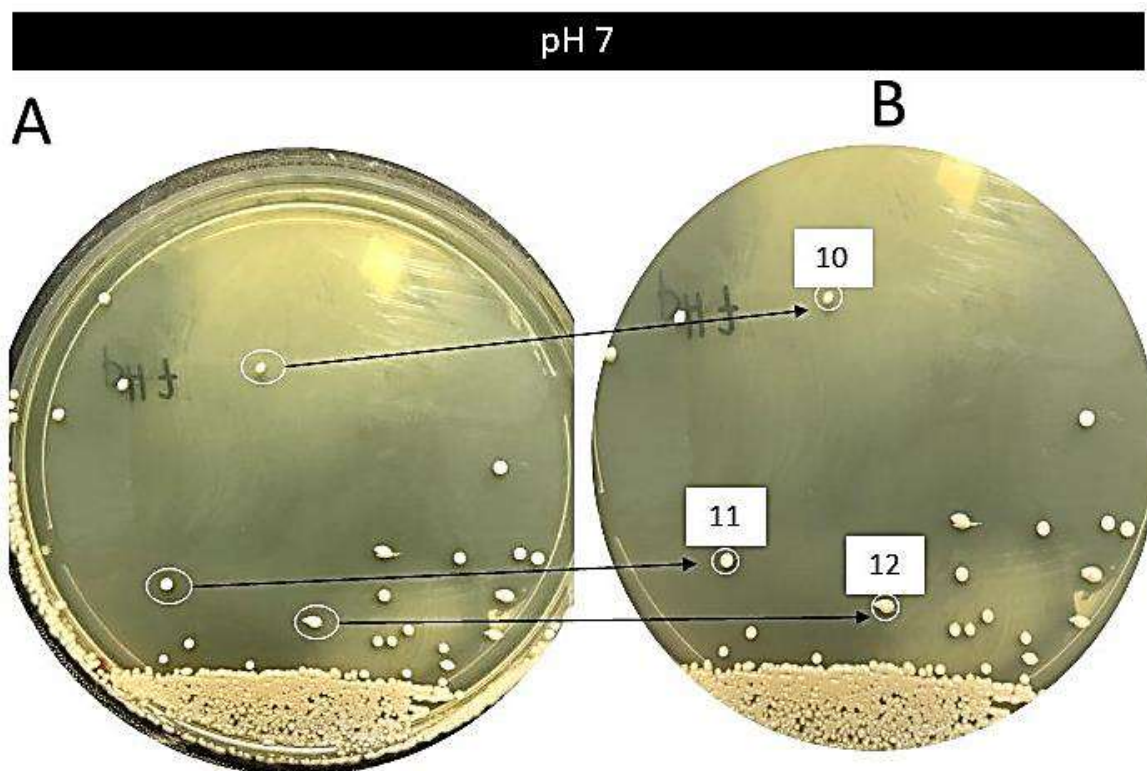
Os cultivos nas concentrações de 1%, 5% e 10% de NaCl não apresentaram crescimento de colônias após os 7 dias de cultivo.

Figura 39 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após cultivo com 0,9% de NaCl. Painel A tamanho original das colônias – Painel B colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas. (Fonte: Próprio autor)



A Figura 40 exibe as colônias obtidas após o cultivo no pH 7, a colônia 10 apresenta forma irregular e margem inteira, a colônia 11 apresenta forma circular e margem inteira e a colônia 12 apresenta forma irregular e margem lobulada.

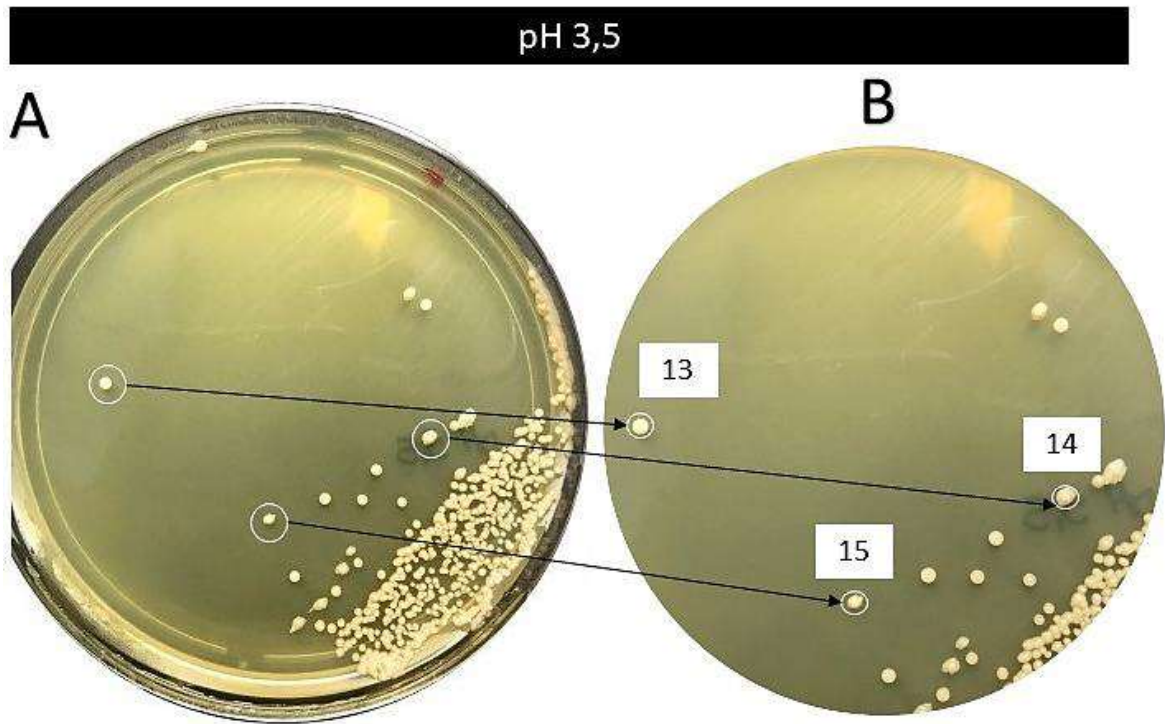
Figura 40 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após cultivo com pH 7. Paineis A e B mostram o tamanho original das colônias e colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas. (Fonte: Próprio autor)



Na Figura 41 são exibidas as colônias selecionadas após o cultivo no pH 3,5. A colônia 13 apresenta forma circular e margem inteira, a colônia 14 apresenta forma irregular e margem ondulada e a colônia 15 apresenta forma irregular e margem ondulada.

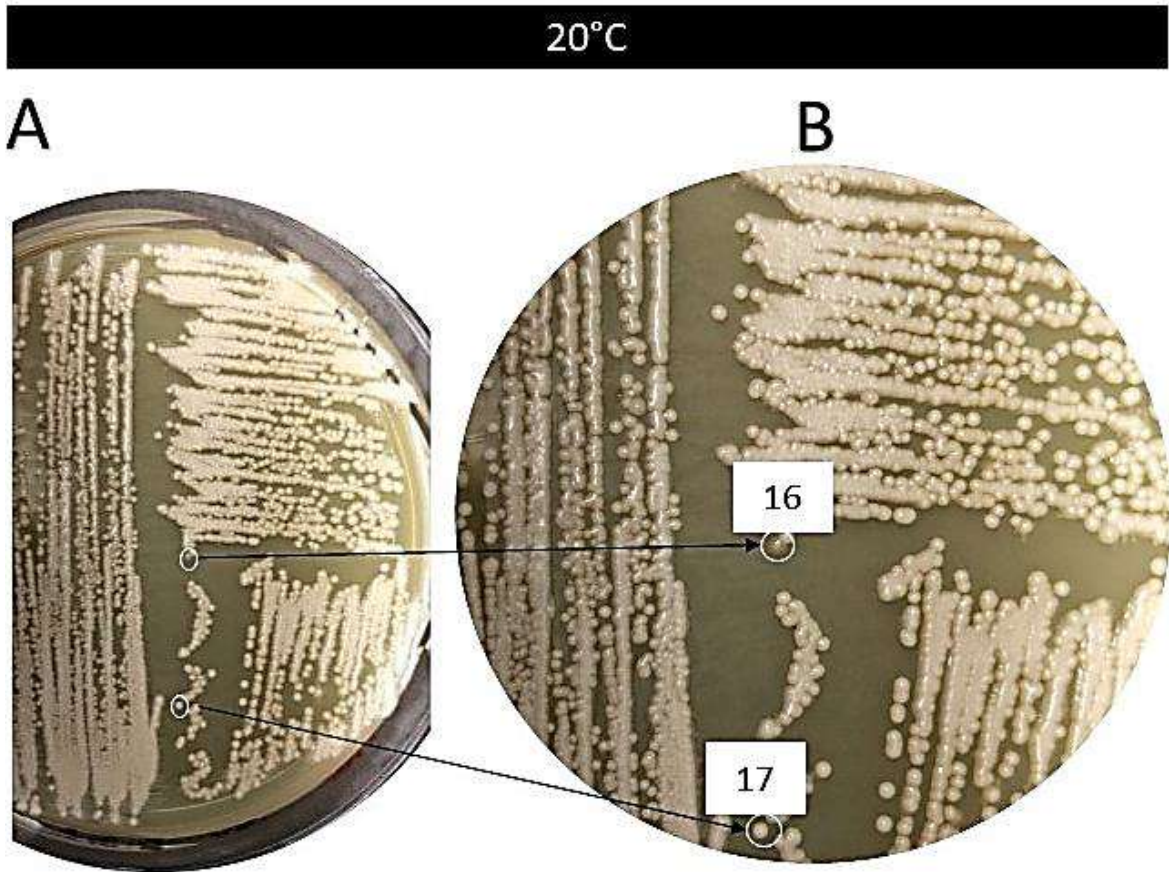
O cultivo realizado em pH 10 não apresentou o crescimento de colônias após os 7 dias.

Figura 41 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após cultivo com pH 3,5. Painel A tamanho original das colônias – Painel B colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas. (Fonte: Próprio autor)



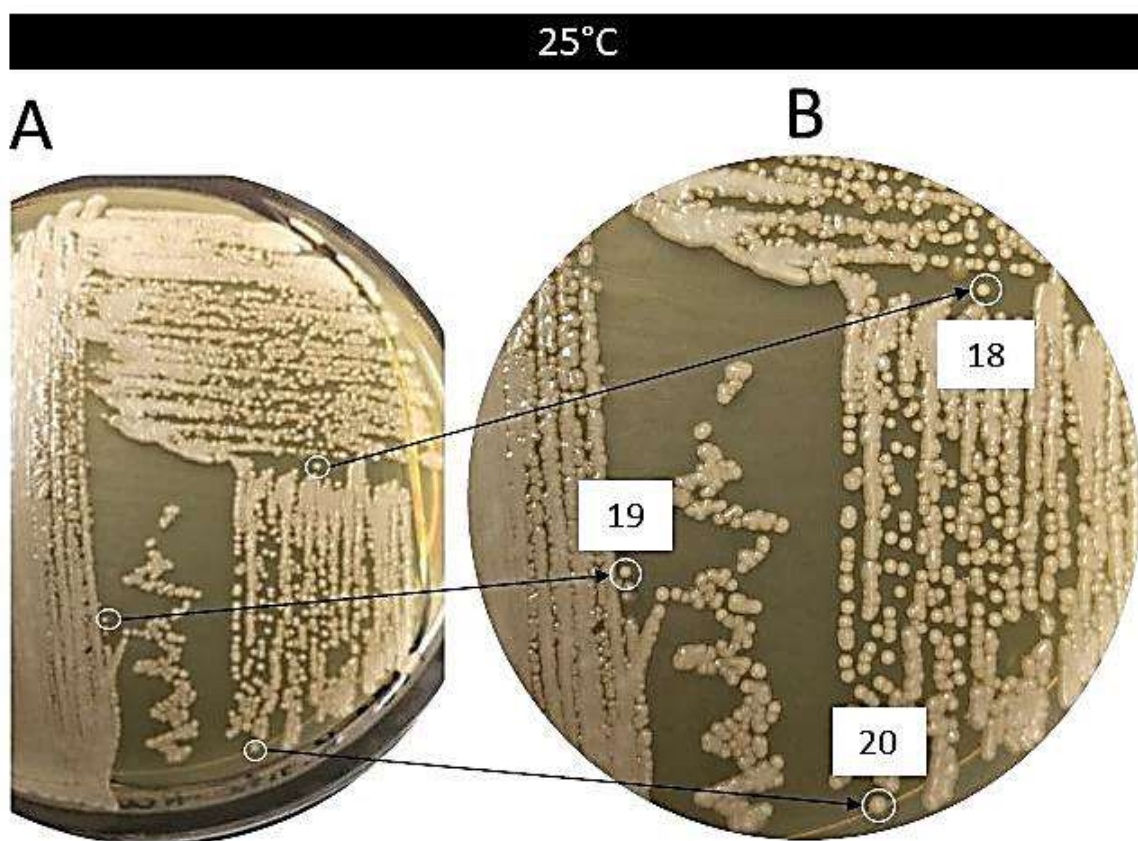
A Figura 42 apresenta as colônias selecionadas após o cultivo na temperatura de 20°C. A colônia 16 exibiu cor marrom, forma circular e margem inteira e a colônia 17 apresentou cor branca, forma circular e margem inteira. Ambas a colônias apresentaram tamanhos menores da original.

Figura 42 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após cultivo a 20°C. Painel A tamanho original das colônias – Painel B colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas. (Fonte: Próprio autor)



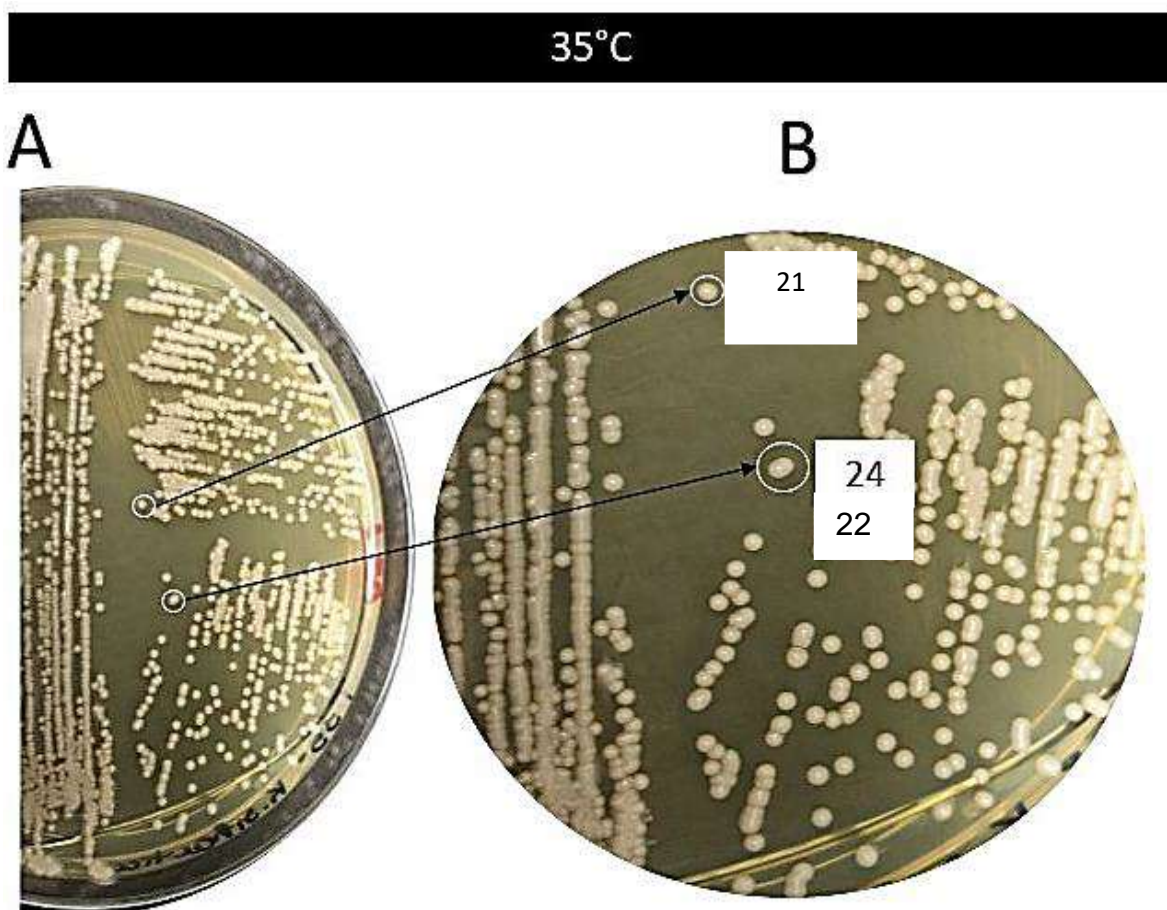
A Figura 43 exibe as colônias selecionadas após o cultivo a 25°C. As colônias 18, 19 e 20 apresentaram forma circular e margem inteira, porém com diferentes tamanhos entre as 3.

Figura 43 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após cultivo a 25°C. Painel A tamanho original das colônias – Painel B colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas. (Fonte: Próprio autor)



A Figura 44 exibe as colônias selecionadas após o cultivo a 35°C. A colônia 21 apresenta forma circular e margem inteira e a 22 apresenta forma irregular e margem inteira.

Figura 44 - Aspecto macroscópico das colônias selecionadas após cultivo a 35°C. Painel A tamanho original das colônias – Painel B colônias em tamanhos aumentados para melhor visualização das características morfológicas. (Fonte: Próprio autor)



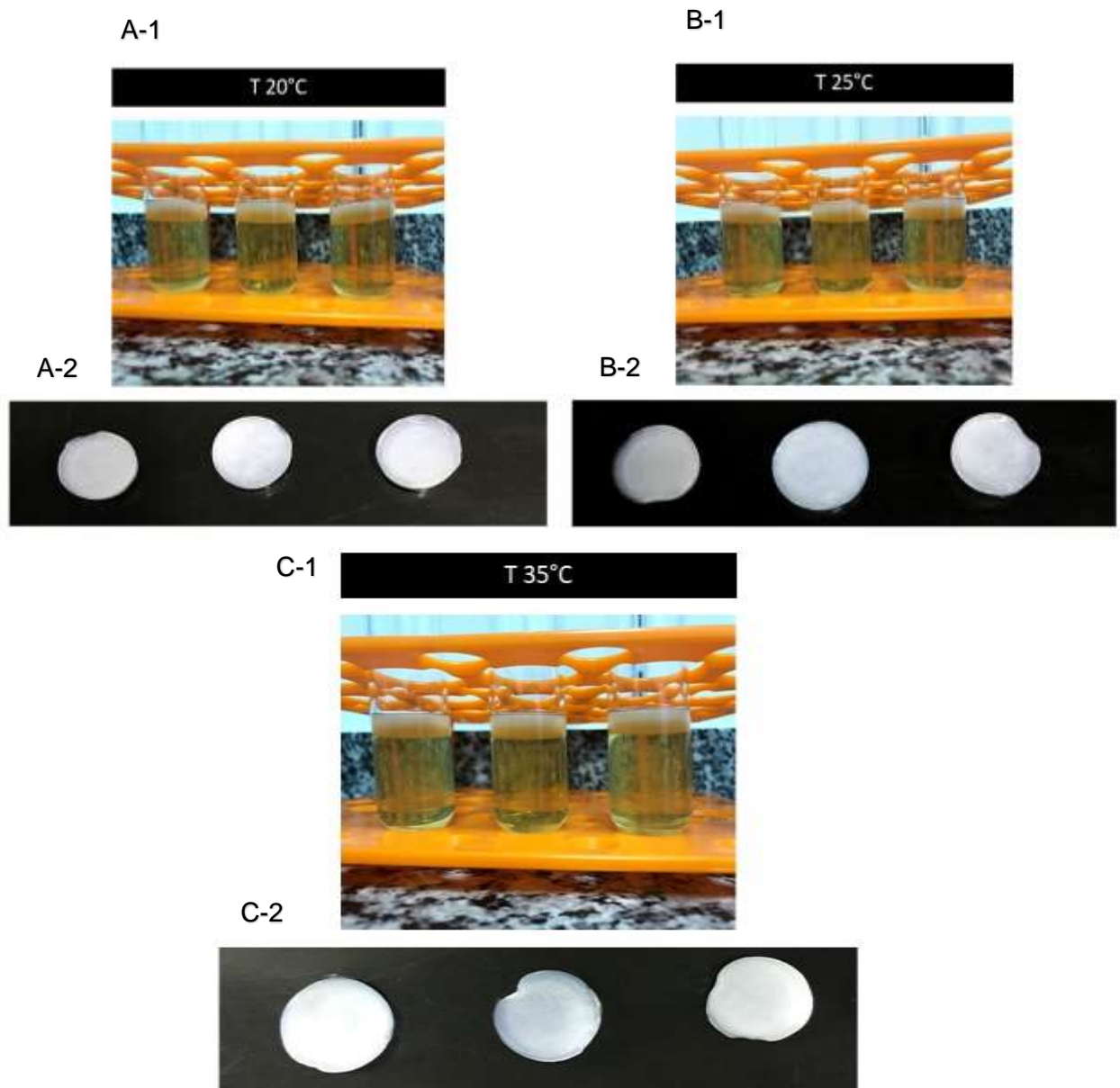
2.2. Produção das membranas de CB após aplicação das pressões seletivas

A produção de CB foi inicialmente em tubos de ensaio, para a análise das 24 colônias selecionadas. Das 22 colônias, apenas cinco não foram capazes de produzir CB as de número 2, 4, 5, 6 e 16.

A Figura 45 nos Painéis A-1, B-1 e C-1, que se referem as temperaturas de 20°C, 25°C e 35°C respectivamente, apresentam os cultivos em triplicata realizados. Como pode ser observado não houve diferenças macroscópicas das membranas das triplicatas, apresentando a mesma espessura e mesma dimensão. Nos painéis A-2 e B-2 são apresentados os aspectos macroscópicos das membranas de CB após o processamento. Como pode ser observado não houve

diferenças macroscópicas entre as triplicas produzidas nas diferentes temperaturas utilizadas.

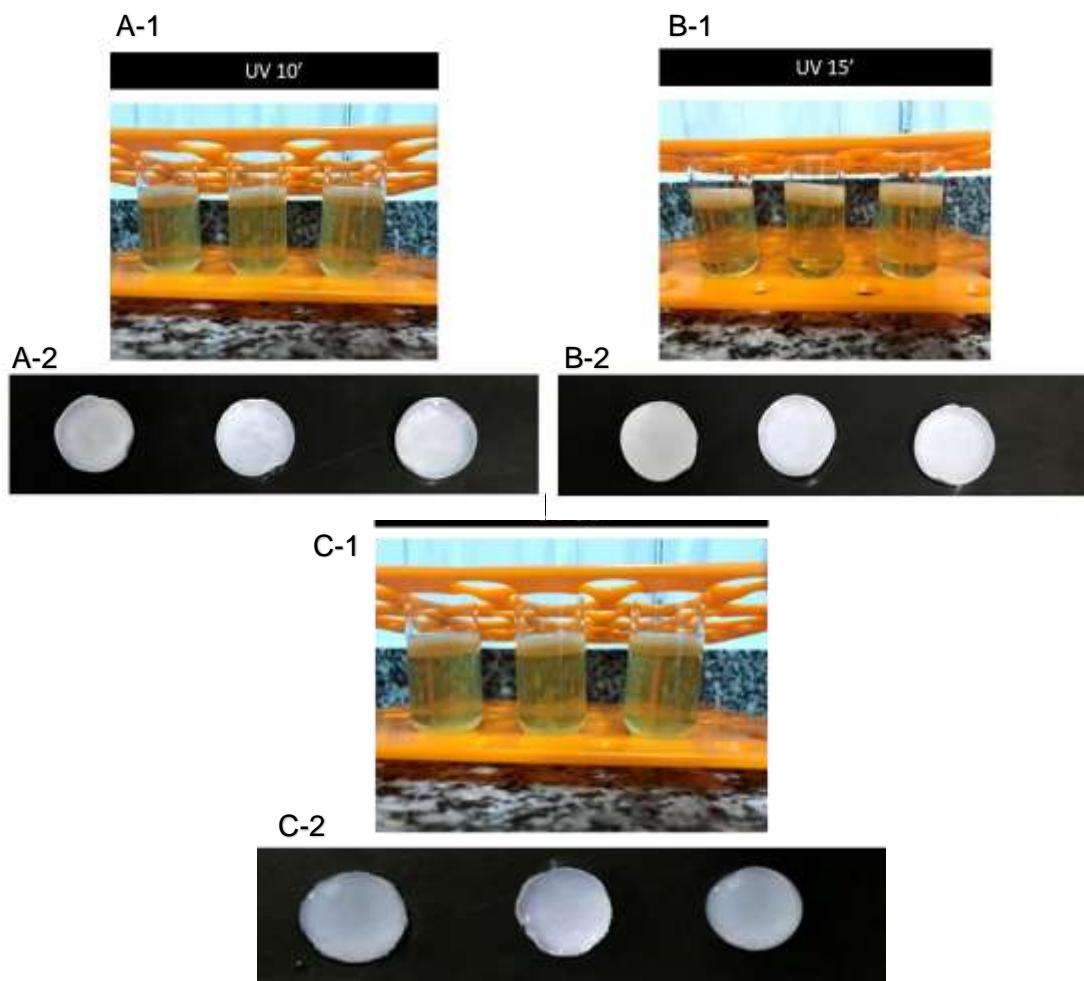
Figura 45 - Cultivo em triplicada e aspecto macroscópico das membranas de CB produzidas após a aplicação da pressão seletiva Temperatura. Painel A-1 e A-2 membranas de CB produzidas após o cultivo a 20°C. Painel B-1 e B-2 membranas de CB produzidas após o cultivo a 25°C. Painel C-1 e C-2 membranas de CB produzidas após o cultivo a 35°C. (Fonte: Próprio autor)



Na Figura 46 os Painéis A-1, B-1 e C-1, que se referem aos tempos de exposição à luz UV por 10, 15 e 30 minutos respectivamente, apresentam os cultivos em triplicata realizados. Como pode ser observado não houve diferenças macroscópicas das membranas (triplicata) as quais apresentaram a mesma

espessura e mesma dimensão. Nos painéis A-2, B-2 e C-2 são apresentados os aspectos macroscópicos das membranas de CB após o processamento. Como pode ser observado, não houve diferenças macroscópicas entre as triplicas produzidas nos tempos de exposição à luz UV.

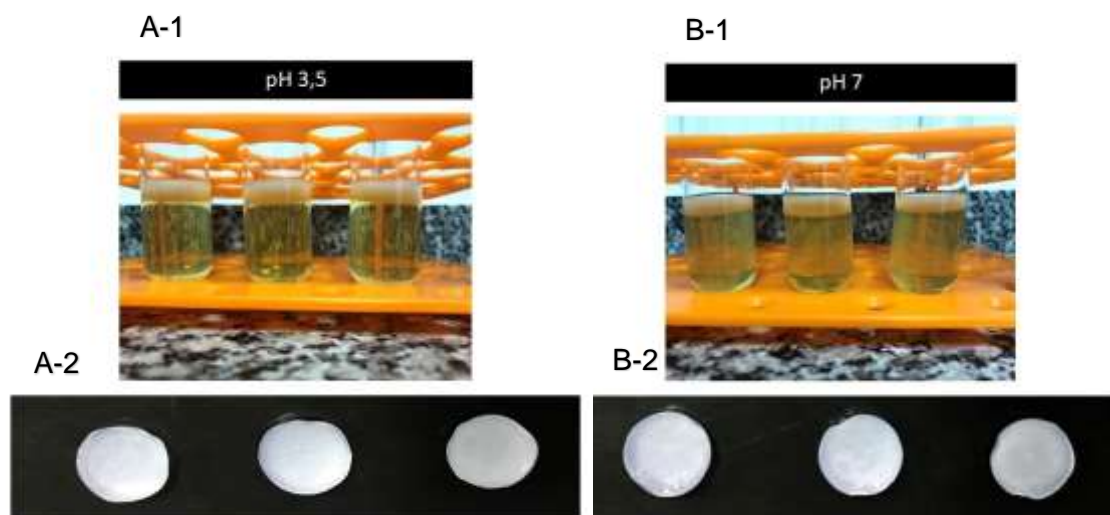
Figura 46 - Cultivo em triplicada e aspecto macroscópico das membranas de CB produzidas após a aplicação da pressão seletiva exposição à luz UV. Painel A-1 e A-2 membranas de CB produzidas após exposição à luz UV por 10 minutos. Painel B-1 e B-2 membranas de CB produzidas após exposição à luz UV por 15 minutos e Painel C-1 e C-2 membranas de CB produzidas após exposição à luz UV por 30 minutos. (Fonte: Próprio autor)



Na Figura 47 os Painéis A-1 e B-1, que se referem ao pH 3,5 e 7 respectivamente, apresentam os cultivos em triplicata realizados. Como pode ser observado não houve diferenças macroscópicas das membranas (triplicata) as quais apresentaram a mesma espessura e mesma dimensão. Nos painéis A-2 e B-2 são apresentados os aspectos macroscópicos das membranas de CB após o

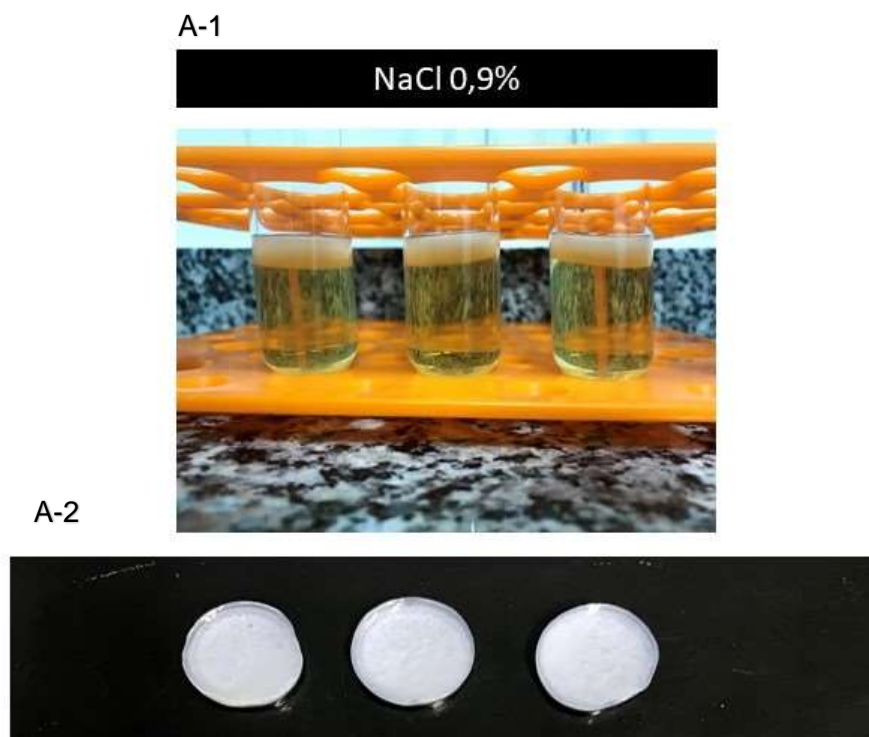
processamento. Como pode ser observado, não houve diferenças macroscópicas entre as triplicas produzidas.

Figura 47 - Cultivo em triplicata e aspecto macroscópico das membranas de CB produzidas após a aplicação da pressão seletiva pH. Painel A-1 e A-2 membranas de CB produzidas após cultivo em pH 3,5. Painel B-1 e B-2 membranas de CB produzidas após cultivo em pH 7. (Fonte: Próprio autor)



Na Figura 48 o Painel A-1, que se refere a concentração de 0,9% de NaCl, apresenta os cultivos em triplicata realizados. Como pode ser observado não houve diferenças macroscópicas das membranas (triplicata) as quais apresentaram a mesma espessura e mesma dimensão. No painel A-2 são apresentados os aspectos macroscópicos das membranas de CB após o processamento. Como pode ser observado, não houve diferenças macroscópicas entre as triplicas produzidas.

Figura 48 - Cultivo em triplicada (Painel A-1) e aspecto macroscópico das membranas (Painel A-2) de CB produzidas após a aplicação da pressão seletiva Pressão osmótica. (Fonte: Próprio autor)



2.3. Análise do *Rms* e *%Int* das membranas de CB produzidas após a aplicação das pressões seletivas

As membranas produzidas utilizando as cepas que foram submetidas a tempos diferentes de exposição UV apresentaram maior *Rms* em comparação as demais. A exposta por 15 minutos apresentou um rendimento de 8mg/L e a exposta a luz UV por 10 minutos de 6,88 mg/L não havendo uma diferença estatisticamente significativa entre elas. As membranas produzidas após as demais aplicações seletivas, apresentaram *Rms* entre 5,27 mg/L e 6,23 mg/L não havendo diferenças significativas entre elas, como pode ser visto na Tabela 10.

Com base nesses resultados, pode-se inferir que a pressão seletiva referente a exposição à luz UV pode ter provocado alterações genéticas que promoveram alguma alteração relacionada a atividade da via metabólica de produção de CB, tendo em vista que todas as colônias obtidas após submissão às diferentes pressões seletivas, foram originárias de um mesmo pré-inóculo. Sendo assim, a avaliação das características genéticas das colônias, são de suma importância, para novas etapas do presente trabalho.

A análise da porcentagem de intumescimento permite avaliar a capacidade que as membranas de CB têm que adsorver água após a desidratação completa. Os resultados obtidos indicam porcentagens entre 68% e 75%, resultados promissores considerando que após a desidratação completa, as membranas de CB nunca recuperam 100% de água.

Tabela 10 – *Rms* e %*Int* das membranas produzidas após a aplicação das diferentes pressões seletivas

CB	<i>Rms</i> (g/L)	% INT
20°C	0,0545 *(± 0,004)	74,07
25°C	0,0583 *(± 0,012)	73,82
35°C	0,0593 *(± 0,003)	72,74
UV 10'	0,0688 *(± 0,023)	70,97
UV 15'	0,0800 *(± 0,014)	68,59
UV 30'	0,0598 *(± 0,007)	71,93
pH 3,5	0,0623 *(± 0,002)	71,79
pH 7	0,0605 *(± 0,009)	69,85
NaCl 0,9%	0,0527 *(± 0,001)	75,93

2.4. Caracterização físico-química das membranas de CB

2.4.1. FT-IR

As membranas de CB foram caracterizadas por FT-IR para confirmar a identidade química das membranas. Os espectros FT-IR das membranas de CB (Figuras 49, 50, 51 e 52) mostraram as características típicas de substratos celulósicos para todas as amostras, com bandas em torno de 3350 cm⁻¹ correspondentes ao estiramento de OH, 2800-2900 cm⁻¹ correspondendo ao estiramento de CH, 1160 cm⁻¹ correspondendo ao estiramento de C-O-C e 1035-1060 cm⁻¹ correspondente ao estiramento de C-O. Esses resultados indicam que as condições de estresse não afetaram a estrutura química das amostras, conforme esperado. Esses resultados foram obtidos também por Lazarini e colaboradores,

quando aplicaram pressões seletivas em cultivos de *K. hansenii* (Lazarini *et al.*, 2018).

Figura 49 - Espectros de FT-IR das membranas de CB produzidas após a aplicação da pressão seletiva temperatura. (Fonte: Próprio autor)

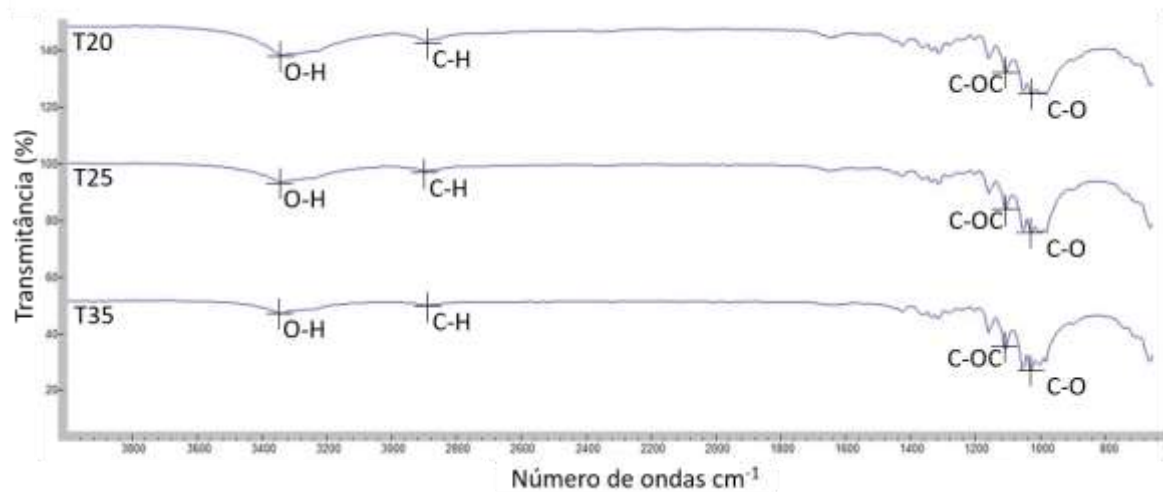


Figura 50 - Espectros de FT-IR das membranas de CB produzidas após a aplicação da pressão seletiva exposição a luz UV. (Fonte: Próprio autor)

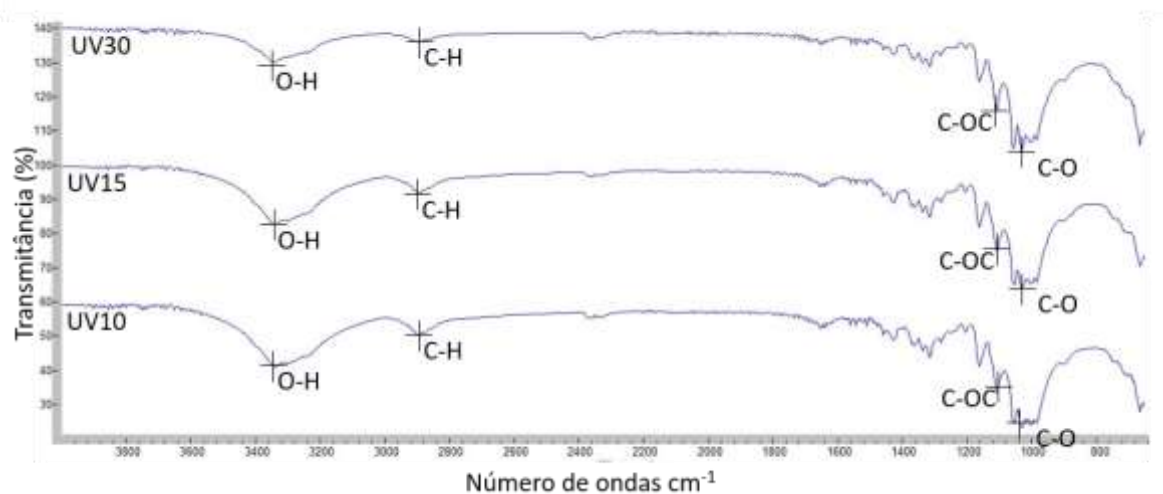


Figura 51 - Espectros de FT-IR das membranas de CB produzidas após a aplicação da pressão seletiva pH. (Fonte: Próprio autor)

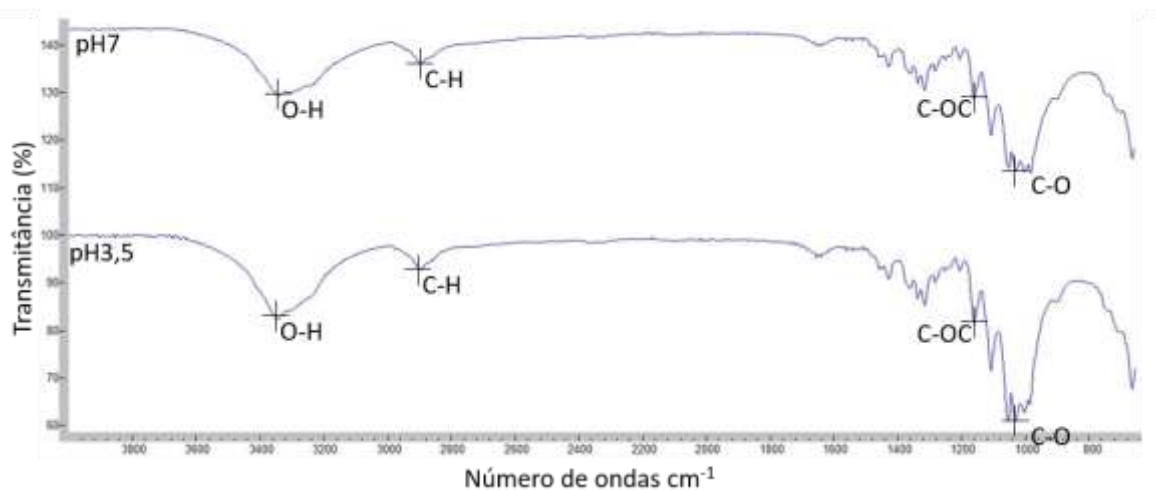
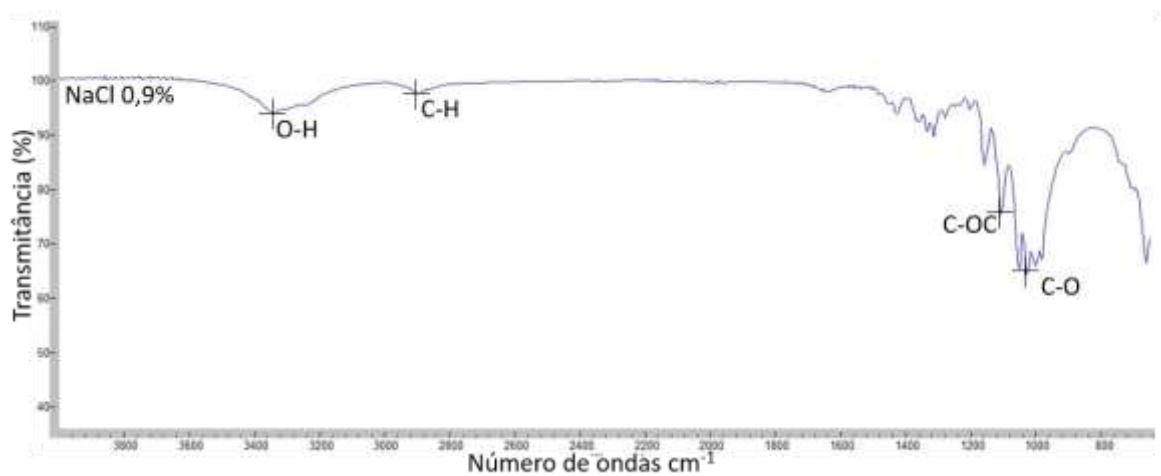


Figura 52 - Espectros de FT-IR das membranas de CB produzidas após a aplicação da pressão seletiva pressão osmótica. (Fonte: Próprio autor)



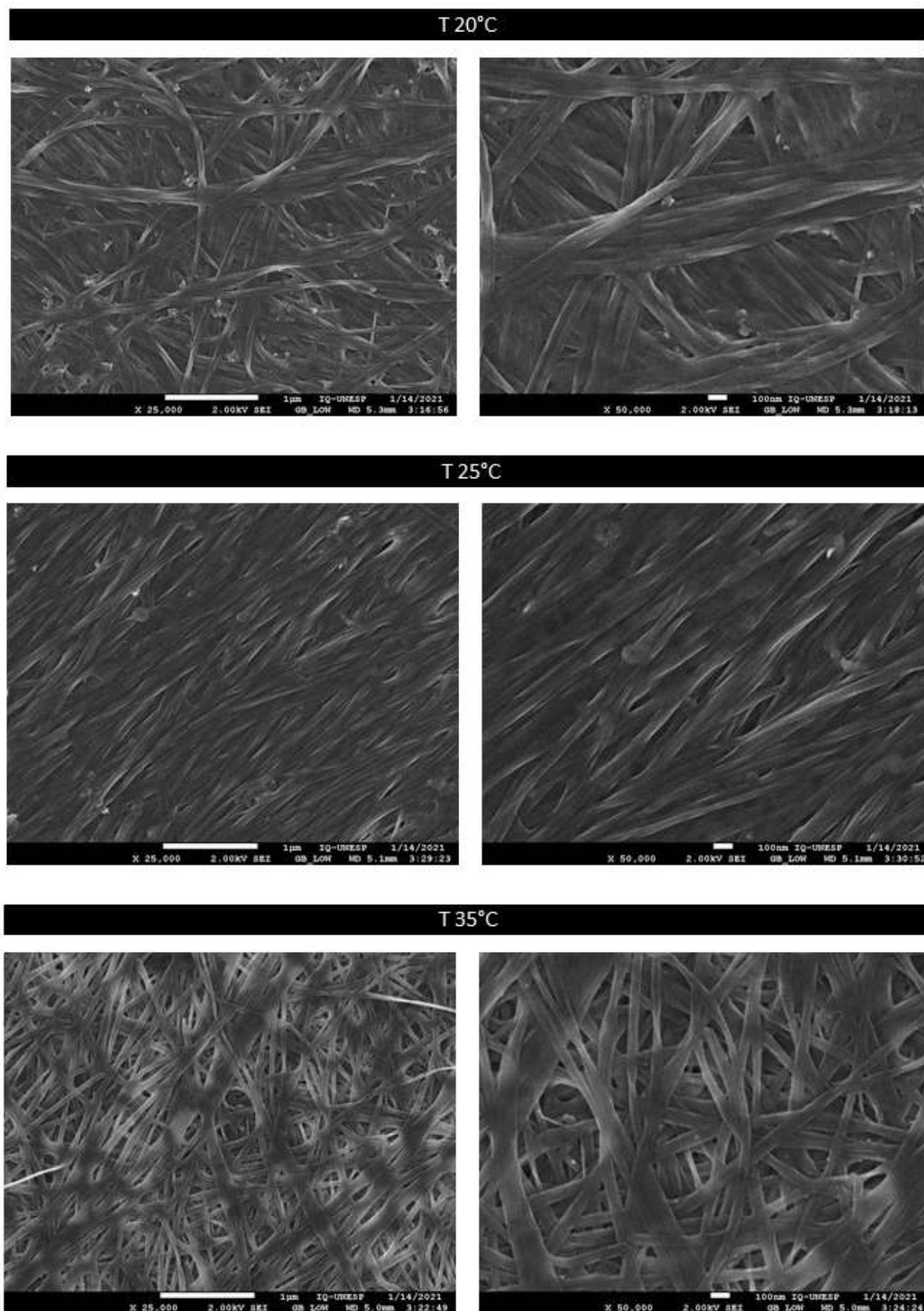
2.4.2. Caracterização por MEV

A análise das características morfológicas das membranas produzidas indicou haver diferenças com relação a disposição das fibras de acordo com a pressão seletiva aplicada.

As membranas de CB produzidas nas diferentes temperaturas (Figura 53) são significativamente diferentes entre si, a membrana que a bactéria foi submetida a 20°C apresenta um entrelaçamento de fibras relativamente semelhante à de 35°C

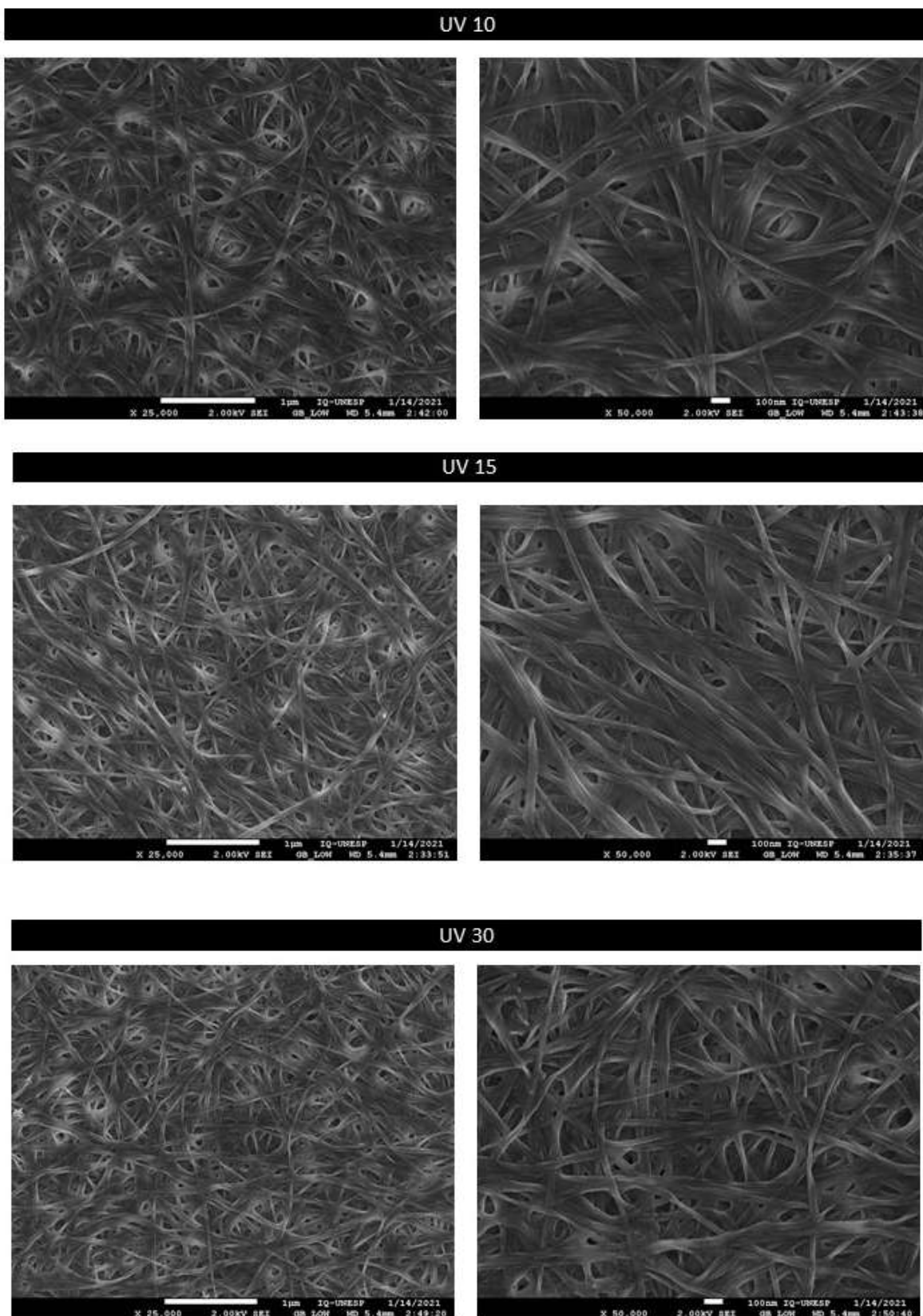
porém com fibras mais espessas, por outro lado a 25°C possui uma disposição de fibras que não se assemelha com as demais, apresentando poucos poros principalmente se comparado com a 35°C. Esses resultados indicam a possibilidade de que a temperatura alterou a atividade metabólica das bactérias, ocasionando as diferenças de fibras durante a produção.

Figura 53 – MEV das membranas produzidas após a aplicação da pressão seletiva temperatura nos aumentos de 25.000x e 50.000x. (Fonte: Próprio autor)



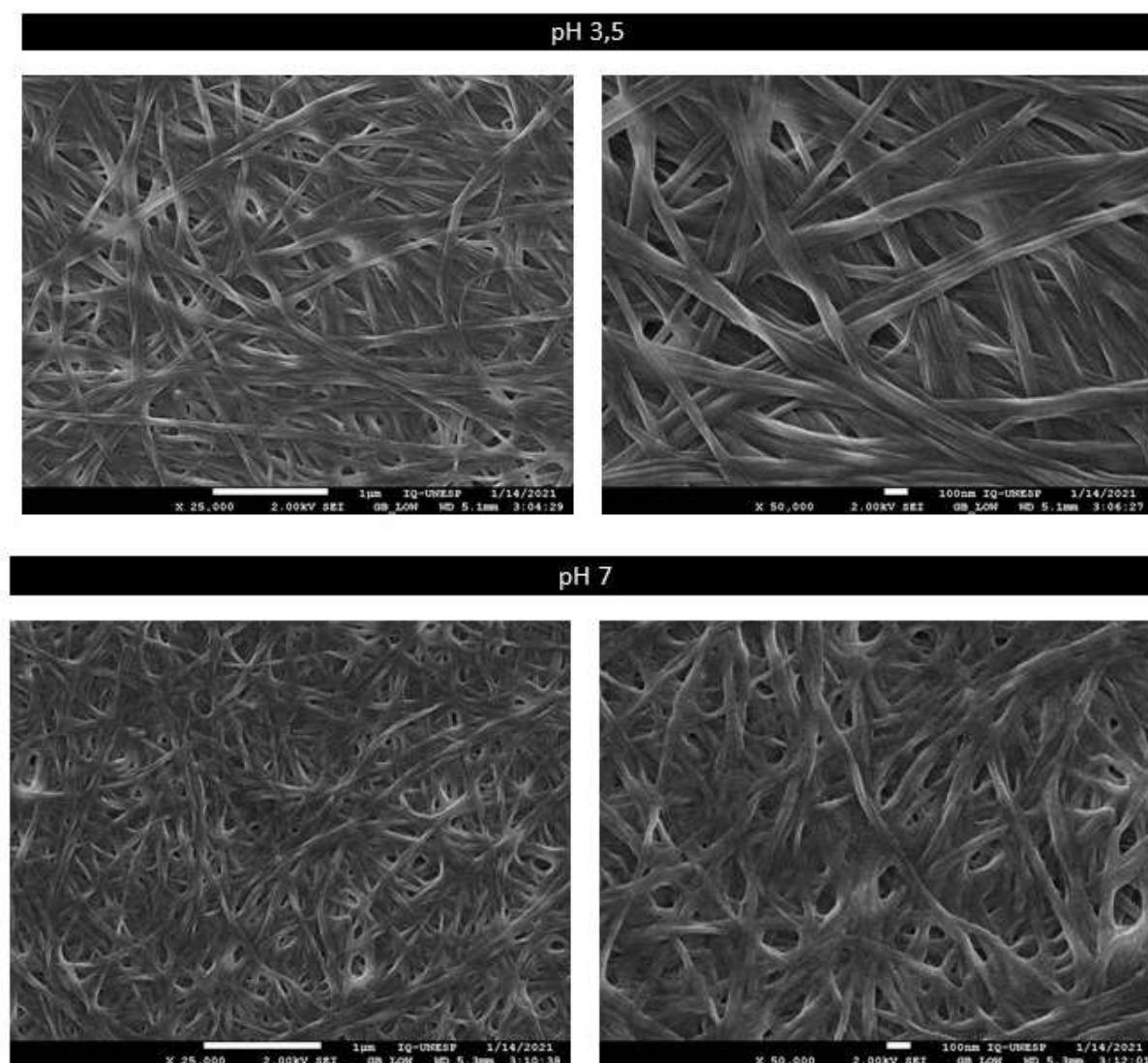
Os resultados apresentados na Figura 54 demonstram a influência do tempo de exposição à luz UV na modificação do entrelaçamento e espessura das fibras das membranas de CB, diferente das micrografias das temperaturas, as membranas produzidas após essa exposição não apresentaram grandes diferenças entre si, apresentando espessura de fibras semelhantes, porém com diferentes graus de entrelaçamento.

Figura 54 - MEV das membranas produzidas após a aplicação da pressão seletiva exposição a luz UV nos aumentos de 25.000x e 50.000x. (Fonte: Próprio autor)



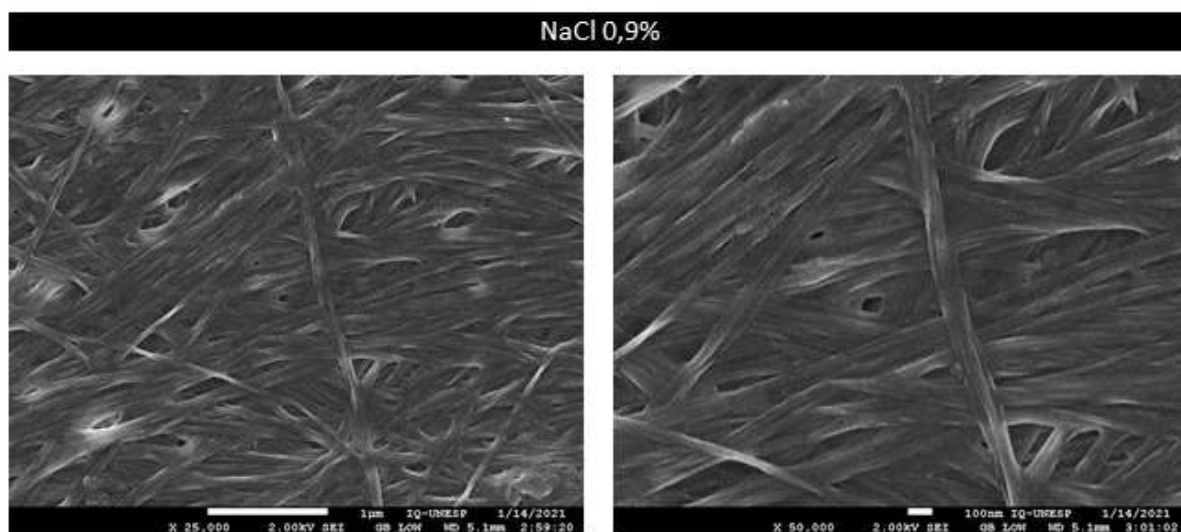
Como observado na Figura 55 houve diferenças estruturais das membranas de acordo o pH utilizado. Apesar da espessura das fibras não diferirem muito entre si, o entrelaçamento das membranas variou muito, demonstrando que as condições químicas também afetam a atividade metabólica da produção de CB, influenciando na morfologia.

Figura 55 - MEV das membranas produzidas após a aplicação da pressão seletiva em diferentes pH nos aumentos de 25.000x e 50.000x. (Fonte: Próprio autor)



Os resultados apresentados na Figura 56, demonstram que houve diferenças com relação ao entrelaçamento e espessura das fibras utilizando 0,9% de NaCl. Um entrelaçamento com poros menos aparentes e um entrelaçamento com fibras mais fechadas, sendo relativamente semelhante com a membrana da temperatura de 25°C.

Figura 56 - MEV das membranas produzidas após a aplicação da pressão seletiva pressão osmótica nos aumentos de 25.000x e 50.000x. (Fonte: Próprio autor)



Diante dos resultados obtidos nesta etapa dos experimentos, pode-se sugerir que as pressões seletivas (temperatura, pH, pressão osmótica e exposição à luz UV) influenciam significativamente o metabolismo bacteriano na produção de CB vez que todos os cultivos foram realizados utilizando a mesma densidade ótica (0,5 de MacFarland) e o mesmo meio de cultivo, sendo assim as diferenças de morfologia estão diretamente ligadas as diferentes UFC que foram selecionadas para a produção de CB após a aplicação das pressões seletivas.

2.5. Liberação de CRO utilizando as membranas de CB como suporte

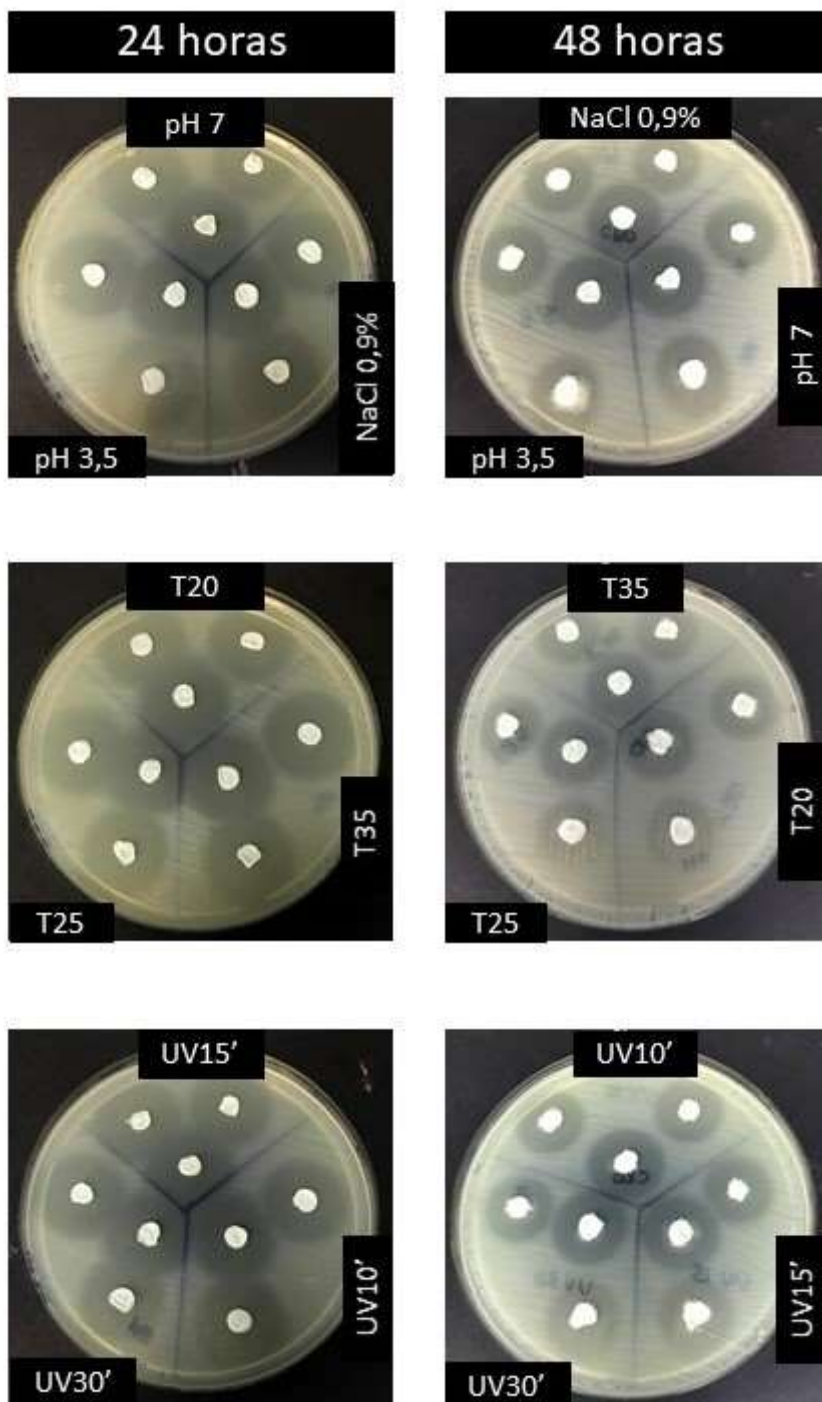
A liberação de CRO utilizando as membranas de CB obtidas após a aplicação das pressões seletivas ocorreu por 48h. Os halos de inibição não apresentaram diferenças significativas entre si, variando entre 2,5 cm e 2,9 cm ao final das 48h, como pode ser visto na Tabela 11 e na Figura 57.

Os resultados são semelhantes aos obtidos na liberação utilizando as membranas de CB produzidas nos meios dos resíduos, indicando que a liberação desse fármaco não esteja associada apenas a membrana de CB, uma vez que se trata de um fármaco extemporâneo, ou seja, um fármaco instável quando mantido por muito tempo em solução, podendo ocorrer a sua degradação.

Tabela 11 – Medida dos halos de inibição do crescimento bacteriano utilizando as membranas de CB obtidas após a aplicação das pressões seletivas para a liberação de CRO

CRO - Halo de inibição (cm)									
(± 1mm)									
Tempo (h)	T20°C	T25°C	T35C	UV10	UV15	UV30	NaCl 0,9%	pH 3,5	pH 7
24	3,2	3,3	3,2	3,3	3,0	3,0	3,2	3,2	3,4
48	2,5	2,5	2,5	2,9	2,7	2,7	2,7	2,8	2,8
72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Figura 57 - Resultados dos ensaios de liberação sustentada de CRO nos tempos de 24 e 48 horas de liberação, utilizando membranas de CB produzidas após a aplicação das pressões seletivas. (Fonte: Próprio autor)



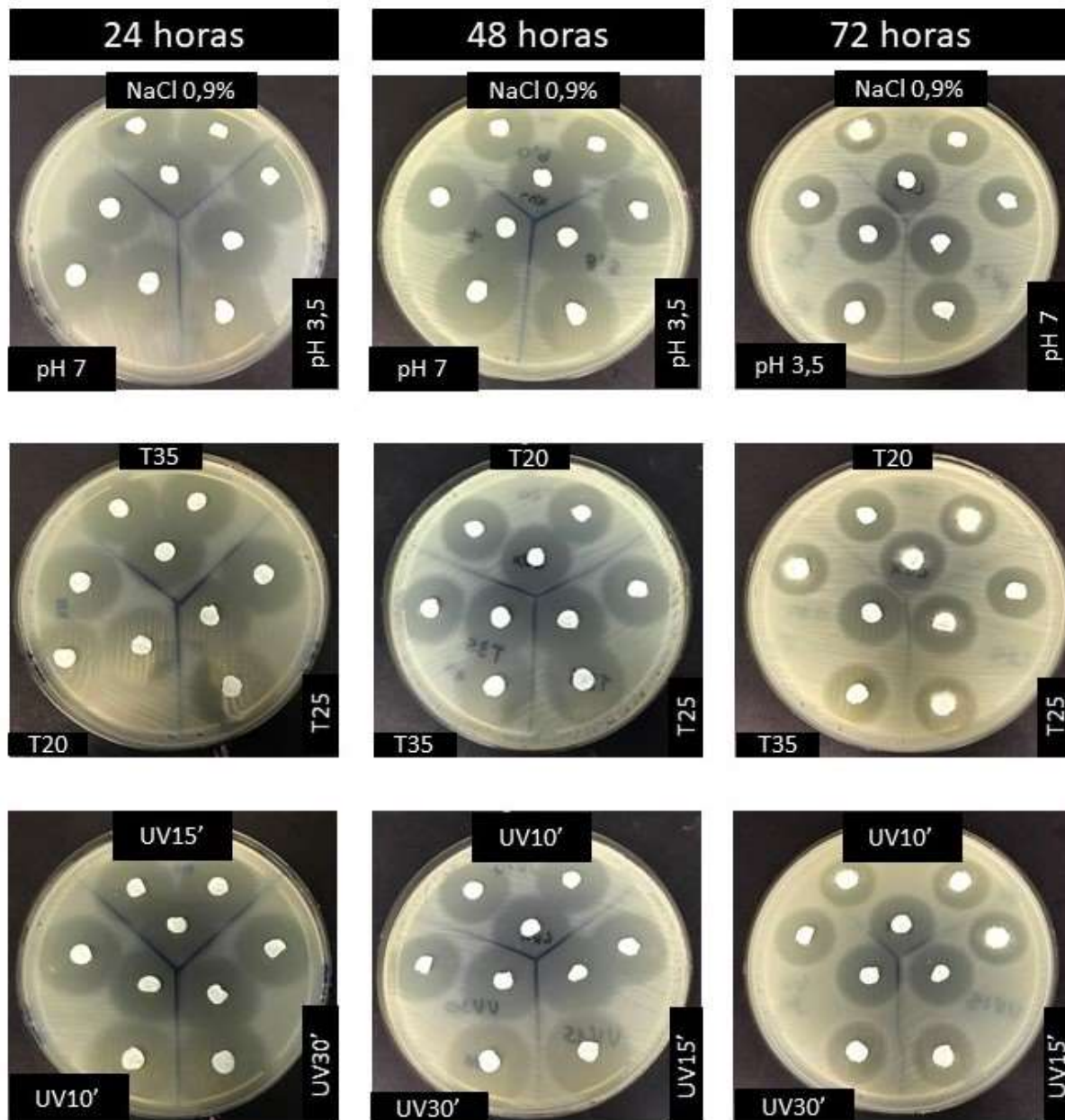
2.6. Liberação de LVX utilizando membranas de CB como suporte

A liberação de LVX utilizando as membranas de CB obtidas após a aplicação de pressões seletivas ocorreu por 72h (Tabela 12 e Figura 58). Os halos ao final da liberação não apresentaram diferenças significativas, o que pode indicar que as diferentes pressões seletivas não influenciaram nas características de liberação entre si. Porém quando comparado com a liberação do mesmo fármaco utilizando as membranas produzidas nos meios de resíduos, foi superior, liberando por 24h a mais. Como nos resultados obtidos na liberação de CRO, a estabilidade do fármaco também pode ter influenciado a liberação de LVX, de acordo com as análises morfológicas por MEV houve diferenças no entrelaçamento e espessura das fibras de acordo com a pressão seletiva aplicada, sendo esses parâmetros que influenciam na liberação dos fármacos, sendo assim, a liberação de LVX em todas as membranas durarem 72h pode, também, estar relacionada com a degradação do fármaco, perdendo assim a atividade.

Tabela 12 - Medida dos halos de inibição do crescimento bacteriano utilizando as membranas de CB obtidas após a aplicação das pressões seletivas para a liberação de LVX

Tempo (h)	LVX- Halo de inibição (cm)								
	T20°C	T25°C	T35C	UV10	UV15	UV30	NaCl 0,9%	pH 3,5	pH 7
24	3,7	3,7	3,4	3,5	3,6	3,7	3,6	3,8	3,8
48	3,2	3,1	3,2	3,6	3,6	3,5	3,5	3,8	3,6
72	2,7	2,6	2,8	2,8	2,7	2,8	2,9	2,7	2,7
96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Figura 58 - Resultados dos ensaios de liberação sustentada de LVX nos tempos de 24, 48 e 72 horas de liberação, utilizando membranas de CB produzidas após a aplicação das pressões seletivas. (Fonte: Próprio autor)



Os resultados, aqui obtidos, demonstraram que a aplicação das pressões química e físicas para a obtenção de variantes de cepas bacterianas de *K. rhaeticus* AF-1 com maior capacidade de produção de membranas de CB foi atingido com sucesso, demonstrando a importância de estudos que busquem tais variantes para outras espécies, o que pode proporcionar aumento da capacidade

produtiva com menor custo para permitir maior facilidade e disponibilidade de membranas de CB para utilização médico-farmacêutica e industriais.

3. Conclusões

A utilização de cepas de *K. hansenii* ATCC 23769 e *K. rhaeticus* AF-1 e resíduos de hortifrúti demonstraram grande potencial de produção membranas de CB;

A utilização de resíduos de hortifrúti para a produção de CB reduz os custos sendo economicamente viável e ecologicamente correto;

A espécie *K. rhaeticus* apresentou melhores resultados na produção de CB em relação à espécie *K. hansenii*;

A membrana produzida por *K. rhaeticus* no meio T70 apresentou *Rms* superior, seguido de T100 porém, sem diferenças significativas;

As porcentagens de intumescimento das membranas produzidas por *K. rhaeticus* nos meios T10 e M10, foram superiores em relação às outras concentrações de resíduos;

A porcentagem de intumescimento das membranas produzidas por *K. hansenii* no meio T100 foi superior ao das membranas produzidas no meio T70;

O intumescimento das membranas produzidas por *K. rhaeticus* no meio T10 e M10 foi superior quando comparado com o intumescimento das membranas produzidas por *K. hansenii* nos meios T100 e T70.

A utilização de resíduos não alterou a pureza das membranas de CB demonstrados pelos resultados da caracterização por TGA/DTG e FT-IR;

A MEV apresentou diferenças com relação ao entrelaçamento e espessuras das fibras de acordo com o tipo e concentração dos resíduos utilizados como meio de cultivo;

As membranas de CB produzidas pelas duas espécies bacterianas, nos meios de resíduos de hortifrúti, se mostraram promissoras para o uso como suporte de liberação sustentada de CRO, LVX e RFM;

A aplicação de pressões seletivas química e físicas selecionou cepas variantes do cultivo original de *K. rhaeticus*;

O *Rms* e *%Int* das membranas produzidas após a aplicação de pressões seletivas demonstrou que houve diferenças de acordo com a pressão aplicada;

As colônias selecionadas dos cultivos expostos a luz UV por 10 e 15 minutos produziram membranas de CB com *Rms* superior quando comparado com as demais;

As membranas de CB produzidas pelo cultivo com 0,9% de NaCl foram superiores com relação a porcentagem de intumescimento;

Os espectros de FT-IR das membranas produzidas após a aplicação das pressões seletivas indicam que não houve alterações químicas no polímero;

A MEV indicou haver diferenças quanto ao entrelaçamento e espessura das fibras de acordo com a pressão aplicada;

Não houve diferenças nos tempos de liberação de CRO e LVX entre as membranas obtidas com as variantes após as pressões seletivas.

4. Perspectivas

Análise qualitativa e quantitativa, por HPLC ou açúcar redutor, da composição dos meios de cultivos obtidos por meio do processamento de resíduos de hortifrúti;

Complementação dos meios de resíduos de hortifrúti com fontes de carbono variadas e em diferentes concentrações para análise do potencial de produção de CB;

Testes de cinética de liberação, por células de Franz, utilizando as membranas de CB produzidas nos meios de resíduos e pelas variedades de maior capacidade de produção isoladas após pressões seletivas;

Análise da capacidade de retenção e liberação de outros fármacos e moléculas bioativas utilizando as membranas produzidas nos meios de resíduos de hortifruti e obtidas após a aplicação das pressões seletivas.

5. Referências

Abdelraof, M., Hasanin, M. S. And El -Saied, H. (2019) 'Ecofriendly green conversion of potato peel wastes to high productivity bacterial cellulose', *Carbohydrate Polymers*, 211, pp. 75–83. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.095>.

Abeer, M. M., Mohd Amin, M. C. I. And Martin, C. (2014) 'A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: Their biochemistry, current approaches and future prospects', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(8), pp. 1047–1061. Doi: 10.1111/jphp.12234.

Almeida, I. F. *et al.* (2014) 'Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An *in vivo* skin compatibility study', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier B.V., 86(3), pp. 332–336. Doi: 10.1016/j.ejpb.2013.08.008.

Andrade, F. K. *et al.* (2013) 'Studies on the biocompatibility of bacterial cellulose', *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 28(1), pp. 97–112. Doi: 10.1177/0883911512467643.

Anvisa; Medley. 'Bula Rifocort - Pomada Dermatológica'.

Anvisa; Sanofi Farmacêutica. 'Bula Rifocina ® Spray'.

Barud, H. S. *et al.* (2011) 'Antimicrobial bacterial cellulose-silver nanoparticles composite membranes', *Journal of Nanomaterials*, 2011. Doi: 10.1155/2011/721631.

Benson, H. A. E. And Watkinson, A. C. (2011) *Topical and Transdermal Drug Delivery, Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice*. Edited by H. A. E. Benson and A. C. Watkinson. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. Doi: 10.1002/9781118140505.

Cacicedo, M. L. *et al.* (2016) 'Bioresource Technology Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd. Doi: 10.1016/j.biortech.2016.02.071.

Carreira, P. *et al.* (2011) 'Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose', *Bioresource Technology*, 102(15), pp. 7354–7360. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.04.081.

Chen, S.-Q. *et al.* (2018) 'Mechanical properties of bacterial cellulose synthesised by diverse strains of the genus *Komagataeibacter*', *Food Hydrocolloids*, 81, pp. 87–95. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.031>.

CLSI (2019) 'Performance standards for antimicrobial susceptibility testing', Clinical and Laboratory Standards Institute, 29.

Czaja, W. *et al.* (2006) 'Microbial cellulose--the natural power to heal wounds.', *Biomaterials*. Netherlands, 27(2), pp. 145–151. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.07.035.

Davis, R. And Bryson, H. M. (1994) 'Levofloxacin', *Drugs*, 47(4), pp. 677–700. Doi: 10.2165/00003495-199447040-00008.

Dórame-Miranda, R. F. *et al.* (2019) 'Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter entanii* using pecan nutshell as carbon source and its chemical functionalization', *Carbohydrate Polymers*, 207, pp. 91–99. Doi: 10.1016/j.carbpol.2018.11.067.

Duarte, É. B. *et al.* (2019) 'Celulose bacteriana: propriedades, meios fermentativos e aplicações', *Documentos (Embrapa Agroindústria Tropical)*, 186, pp. 1–37.

Fan, X. *et al.* (2016) 'Production of nano bacterial cellulose from beverage industrial waste of citrus peel and pomace using *Komagataeibacter xylinus*', *Carbohydrate polymers*, 151, p. 1068—1072. Doi: 10.1016/j.carbpol.2016.06.062.

Ferreira, P. G., Silva, F. D. C. And Ferreira, V. F. (2017) 'A Importância da Química para a Economia Circular'.

Foster, A., Roberto, S. S. And Igari, A. T. (2016) 'Economia Circular E Resíduos Sólidos: Uma Revisão Sistemática Sobre a Eficiência Ambiental E Econômica', *ENGEMA - Encontro Internacional sobre Gestão Empresarial e Meio Ambiente*, p. 17.

Freitas, L., Besen, G. R. And Jacobi, P. R. (2017) Panorama da implementação da Política Nacional de Resíduos Sólidos: resíduos urbanos, Política Nacional de Resíduos Sólidos: implementação e monitoramento de resíduos urbanos.

Fu, L. *et al.* (2012) 'Skin tissue repair materials from bacterial cellulose by a multilayer fermentation method', *J. Mater. Chem.* The Royal Society of Chemistry, 22(24), pp. 12349–12357. Doi: 10.1039/C2JM00134A.

Gomes, F. P. *et al.* (2013) 'Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue', *Biomass and Bioenergy*, 55, pp. 205–211. Doi: 10.1016/j.biombioe.2013.02.004.

Hestrin, s. and Schramm, m. (1954) 'Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose.', *The Biochemical journal*, 58(2), pp. 345–352. Doi: 10.1042/bj0580345.

Ho Jin, Y. *et al.* (2019) 'Improved production of bacterial cellulose from waste glycerol through investigation of inhibitory effects of crude glycerol-derived compounds by *Gluconacetobacter xylinus*', *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 75, pp. 158–163. Doi: 10.1016/j.jiec.2019.03.017.

Iguchi, M., Yamanaka, S. And Budhiono, A. (2000) 'Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts', *Journal of Materials Science*, 35(2), pp. 261–270. Doi: 10.1023/A:1004775229149.

Islam, M. U. *et al.* (2017) 'Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose', *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, pp. 1166–1173. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.110.

Jahan, F., Kumar, V. And Saxena, R. K. (2018) 'Distillery effluent as a potential medium for bacterial cellulose production: A biopolymer of great commercial importance', *Bioresource Technology*, 250(July 2017), pp. 922–926. Doi: 10.1016/j.biortech.2017.09.094.

Jesus, C. And Pires, I. (2018) 'Fechar o ciclo – A contribuição da economia circular para o combate ao desperdício alimentar', *Revista Ecologias Humanas*, 4, pp. 7–20.

Jung, H.-I. *et al.* (2010) 'Production and Characterization of Cellulose by *Acetobacter* sp. V6 Using a Cost-Effective Molasses–Corn Steep Liquor Medium', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), pp. 486–497. Doi: 10.1007/s12010-009-8759-9.

Jung, R. *et al.* (2009) 'Antimicrobial properties of hydrated cellulose membranes with silver nanoparticles', *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20(3), pp. 311–324. Doi: 10.1163/156856209X412182.

Keskin, Z., Sendemir Urkmez, A. And Hames, E. E. (2017) 'Novel keratin modified bacterial cellulose nanocomposite production and characterization for skin tissue engineering', *Materials Science and Engineering: C. Elsevier B.V*, 75, pp. 1144–1153. Doi: 10.1016/j.msec.2017.03.035.

Kumar, V. *et al.* (2019) 'Efficient and economic process for the production of bacterial cellulose from isolated strain of *Acetobacter pasteurianus* of RSV-4 bacterium', *Bioresource Technology. Elsevier*, 275(December 2018), pp. 430–433. Doi: 10.1016/j.biortech.2018.12.042.

Kurosumi, A. *et al.* (2009) 'Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693', *Carbohydrate Polymers*, 76(2), pp. 333–335. Doi: 10.1016/j.carbpol.2008.11.009.

Lazarini, S. C. *et al.* (2016) 'Characterization of bilayer bacterial cellulose membranes with different fiber densities: a promising system for controlled release of the antibiotic ceftriaxone', *Cellulose*, 23(1), pp. 737–748. Doi: 10.1007/s10570-015-0843-4.

Lazarini, S. C. *et al.* (2018) 'Influence of chemical and physical conditions in selection of *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 strains with high capacity to produce bacterial cellulose for application as sustained antimicrobial drug-release supports', *Journal of Applied Microbiology*, 125(3), pp. 777–791. Doi: 10.1111/jam.13916.

Leitão, A. (2015) 'Economia circular: uma nova filosofia de gestão para o séc. XXI', *Portuguese Journal of Finance, Management and Accounting*, 1(2), p. 23.

Li, Z. *et al.* (2015) 'Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*', Carbohydrate Polymers, 120, pp. 115–119. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.061>.

Lustri, W. R. *et al.* (2015) 'Microbial Cellulose — Biosynthesis Mechanisms and Medical Applications', in Cellulose - Fundamental Aspects and Current Trends. Intech, pp. 133–157. Doi: 10.5772/61797.

Machado, R. T. A. *et al.* (2018) '*Komagataeibacter rhaeticus* grown in sugarcane molasses-supplemented culture medium as a strategy for enhancing bacterial cellulose production', Industrial Crops and Products. Elsevier, 122(December 2017), pp. 637–646. Doi: 10.1016/j.indcrop.2018.06.048.

Mikkelsen, D. *et al.* (2009) 'Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524', Journal of Applied Microbiology, 107(2), pp. 576–583. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04226.x.

Mohammadkazemi, F., Azin, M. And Ashori, A. (2015) 'Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media', Carbohydrate Polymers. Elsevier Ltd., 117, pp. 518–523. Doi: 10.1016/j.carbpol.2014.10.008.

Narasimha Murthy, S. And Shivakumar, H. N. (2010) 'Topical and Transdermal Drug Delivery', in Kulkarni, V. S. (ed.) Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems. Boston: William Andrew Publishing (Personal Care & Cosmetic Technology), pp. 1–36. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-8155-2025-2.10001-0>.

De Oliveira Barud, H. G. *et al.* (2016) 'A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose', Carbohydrate Polymers, 153, pp. 406–420. Doi: 10.1016/j.carbpol.2016.07.059.

Pietak, A. *et al.* (2007) 'Atomic force microscopy characterization of the surface wettability of natural fibres', Applied Surface Science, 253(7), pp. 3627–3635. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2006.07.082>.

Pöttinger, Y., Kralisch, D. And Fischer, D. (2017) 'Bacterial nanocellulose: The future of controlled drug delivery?', Therapeutic Delivery, 8(9), pp. 753–761. Doi: 10.4155/tde-2017-0059.

Richards, D. M. *et al.* (1984) 'Ceftriaxone', *Drugs*, 27(6), pp. 469–527. Doi: 10.2165/00003495-198427060-00001.

Ruka, D. R., Simon, G. P. And Dean, K. M. (2012) 'Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose', *Carbohydrate Polymers*, 89(2), pp. 613–622. Doi: 10.1016/j.carbpol.2012.03.059.

De Salvi, D. T. B. *et al.* (2012) 'Self-supported bacterial cellulose/boehmite organic-inorganic hybrid films', *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 63(2), pp. 211–218. Doi: 10.1007/s10971-012-2678-x.

Shah, N. *et al.* (2013) 'Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material', *Carbohydrate polymers*, 98(2), p. 1585—1598. Doi: 10.1016/j.carbpol.2013.08.018.

Shao, W. *et al.* (2016) 'Controlled release and antibacterial activity of tetracycline hydrochloride-loaded bacterial cellulose composite membranes', *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd., 145, pp. 114–120. Doi: 10.1016/j.carbpol.2016.02.065.

Silva, N. H. C. S. *et al.* (2014) 'Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: In vitro dissolution and permeation studies', *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd., 106(1), pp. 264–269. Doi: 10.1016/j.carbpol.2014.02.014.

Singhsa, P., Narain, R. And Manuspiya, H. (2018) 'Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different *Komagataeibacter xylinus* strains and carbon sources in static and agitated conditions', *Cellulose*. Springer Netherlands, 25(3), pp. 1571–1581. Doi: 10.1007/s10570-018-1699-1.

Souza, M. V. N. (2005) 'Rifampicina, um importante fármaco no combate à tuberculose', *Revista Brasileira de Farmácia*, 86(3), pp. 92–94.

Trovatti, E. *et al.* (2012) 'Bacterial cellulose membranes applied in topical and transdermal delivery of lidocaine hydrochloride and ibuprofen: In vitro diffusion studies', *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V., 435(1), pp. 83–87. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.01.002.

Ul-Islam, M. *et al.* (2013) 'Bacterial cellulose-mmmts nanoreinforced composite films: novel wound dressing material with antibacterial properties', *Cellulose*, 20(2), pp. 589–596. Doi: 10.1007/s10570-012-9849-3.

Ul-Islam, M., Khan, T. And Park, J. K. (2012) 'Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by *in situ* and *ex situ* modification', *Carbohydrate Polymers*, 88(2), pp. 596–603. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.006>.

Ullah, H. *et al.* (2016) Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites, *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd. Doi: 10.1016/j.carbpol.2016.05.029.

Walduck, A. *et al.* (2020) 'Treatment of *Staphylococcus aureus* skin infection in vivo using rifampicin loaded lipid nanoparticles', *RSC Advances*, 10(55), pp. 33608–33619. Doi: 10.1039/d0ra06120d.

Wang, J., Tavakoli, J. And Tang, Y. (2019) 'Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review', *Carbohydrate Polymers*. Elsevier, 219(February), pp. 63–76. Doi: 10.1016/j.carbpol.2019.05.008.

Wei, B., Yang, G. And Hong, F. (2011) 'Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties', *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd., 84(1), pp. 533–538. Doi: 10.1016/j.carbpol.2010.12.017.

Yamada, Y. (2014) 'Transfer of *Gluconacetobacter kakiaceti*, *Gluconacetobacter medellinensis* and *Gluconacetobacter maltaceti* to the genus *Komagataeibacter* as *Komagataeibacter kakiaceti*, *Komagataeibacter medellinensis* and *Komagataeibacter maltaceti*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, pp. 1670–1672. Doi: 10.1099/ijls.0.054494-0.

Yamanaka, S. *et al.* (1989) 'The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose', *Journal of Materials Science*, 24(9), pp. 3141–3145. Doi: 10.1007/BF01139032.

Ye, J. *et al.* (2019) 'Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* ATCC 23767 using tobacco waste extract as culture medium', *Bioresource Technology*, 274(December 2018), pp. 518–524. Doi: 10.1016/j.biortech.2018.12.028.

Zhou, L. L. *et al.* (2007) 'Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(7), pp. 483–489. Doi: 10.1007/s10295-007-0218-4.