

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

Silmara Cristina Lazarini Frajácomo

**Utilização de diferentes composições de meios e
variações de condições de cultivo visando à otimização
da produção de celulose bacteriana para uso em
medicina**

Araraquara
2017

Silmara Cristina Lazarini Frajácomo

Utilização de diferentes composições de meios e variações de condições de cultivo visando à otimização da produção de celulose bacteriana para uso em medicina

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – PPGb-MRQM

Orientador: Prof. Dr. Wilton Rogério Lustrí

Co-orientados: Prof. Dr. Hernane de Silva Barud

Araraquara

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

F875u Frajácómo, Silmara Cristina Lazarini

Utilização de diferentes composições de meios de variações de condições de cultivo visando à otimização da produção de celulose bacteriana para uso em medicina/Silmara Cristina Lazarini Frjácómo. – Universidade de Araraquara, 2017.

74f.

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

Orientador: Prof. Dr. Wilton Rogério Lustrí

Co-Orientador: Prof. Hernane da Silva Barud

1.Celulose bacteriana. 2. Meios de cultivo. 3. Pressões seletivas. 4. Rendimento de produção. 5. Suporte para liberação sustentada de fármacos. I. Título.

CDU 610

DADOS CURRICULARES

Nome: Silmara Cristina Lazarini

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7987248199205915>

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2015

Mestrado em andamento em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Universidade de Araraquara, UNIARA, Brasil.

Título: Utilização de diferentes composições de meios e variações de condições de cultivo visando a otimização da produção de celulose bacteriana para uso em medicina

Orientador: Wilton Rogério Lustrí.

Coorientador: Hernane da Silva Barud.

2009 - 2010

Especialização em Atividade Física, nutrição e Qualidade de vida.

Universidade de Araraquara, UNIARA, Brasil.

Título: Atuação do alho e atum como alimentos funcionais na diminuição do colesterol total em ratos.

Orientador: Prof^ª. Dr. Rita de Cassia Pereira.

2009 - 2012

Graduação em Nutrição.

Universidade de Araraquara, UNIARA, Brasil.

Título: Biossíntese de celulose bacteriana para aplicação como alimento dietético.

Orientador: Prof. Dr. Wilton Rogério Lustrí.

2008 - 2009

Graduação em Pedagogia com habilitação em Gestão Escolar.

Faculdades de Pinhais, FAPI, Brasil.

Título: O Brincar como atividade física: a construção da consciência corporal no ensino infantil proposta pela gestão escolar.

Orientador: Ivan Roberto Franco.

2005 - 2007

Graduação em Educação Física.

Universidade de Araraquara, UNIARA, Brasil.

Título: O Brincar como atividade física: a construção da consciência corporal.

Orientadora: Profa. Ms. Ana Cristina Alves Lima.

2003 - 2006

Graduação em Educação Física.

Universidade de Araraquara, UNIARA, Brasil.

Título: Auto Aprendizagem Dirigida em Natação.

Orientador: Mauricio Tadeu Frajácómo.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2016

Bioquímica aplicada à Biotecnologia.
Universidade de Araraquara, UNIARA, Brasil.
Carga horária: 8h.

2016

Mecanismos gerais e Moleculares de ações dos Fármacos..
Universidade de Araraquara, UNIARA, Brasil.
Carga horária: 8h

2015

Curso on-line de Tutoria: competências e habilidades do tutor on-line
Universidade de Araraquara, UNIARA, Brasil.
Carga horária: 40 horas

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA - UNIARA

2014 - Atual

Vínculo institucional: Bolsista,
Enquadramento Funcional: Apoio Técnico
Bolsista FUNADESP - UNIARA de apoio técnico ao grupo de pesquisa em Química medicinal e Medicina Regenerativa QUIMMERA.

2013 - Atual

Vínculo institucional: Celetista
Enquadramento Funcional: Professora Assistente 1
Professora da disciplina de Atividade Física e Nutrição
Graduação em Educação Física.

E. E. JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA (JBO)

2013 - Atual

Vínculo institucional: Servidor Público
Enquadramento Funcional: Professora efetiva

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

- 1. LAZARINI, SILMARA C.; DE AQUINO, RENATA ; AMARAL, ANDRÉ C. ; CORBI, FABIANA C. A. ; CORBI, PEDRO P. ; BARUD, HERNANE S. ; LUSTRI, WILTON R.**
Characterization of bilayer bacterial cellulose membranes with different fiber densities: a promising system for controlled release of the antibiotic ceftriaxone. Cellulose. v. 23, p. 737-748, 2016.

2. LUSTRI, WILTON R.; **LAZARINI, SILMARA C.** ; LUSTRI, BRUNA CARDINALI; CORBI, PEDRO P. ; SILVA, MARIAALINE C. ; RESENDE NOGUEIRA, FLÁVIA APARECIDA; AQUINO, RENATA ; AMARAL, ANDRÉ C. ; TREU FILHO, OSWALDO; MASSABNI, ANTONIO CARLOS ; DA SILVA BARUD, HERNANE. **Spectroscopic characterization and biological studies in Vitro of a new silver complex with furosemide: Prospective of application as an antimicrobial agent.** Journal of Molecular Structure. v. 1134, p. 386-394, 2017.

ARTIGOS SUBMETIDOS

Revista Cellulose: Influence of chemical and physical conditions in bacterial morphology and cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769. Submissão n°: CELS-D-17-00363

Revista eclética: Biopolímeros: aplicações biomédica e farmacêutica

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS CIENTÍFICOS

LAZARINI, SILMARA C.; BARUD, HERNANE S.; LUSTRI, WILTON R. . **Membranas de Celulose Bacteriana produzidas a partir de meios de cultivo com diferentes fontes de carboidratos para utilização como suporte de liberação sustentada de ceftriaxona.** In: VI Congresso Científico da Unesp e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2016, Araraquara. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2016. v. 37.

GEROMEL-COSTA, C. G. A. ; CORBI, J. ; LUSTRI, W. R. ; **LAZARINI, S. C.** ; CAMPANA, R. . **hexavalente chromium ion complexation by microbial cellulose.** In: XXXIII Congress SIL 2016, 2016, Toronto. International Society of Limnology, 2016.

LAZARINI, S. C.; BARUD, H. S. ; LUSTRI, W. R. . **Utilização de diferentes composições de meios e variações de condições de cultivo visando a otimização da produção de celulose bacteriana para uso em medicina.** In: X Congresso de Iniciação Científica da Uniara, 2015, Araraquara. X Congresso de Iniciação Científica da Uniara, 2015.

ABUCHAIM, R. C. ; **LAZARINI, S. C.** ; LUSTRI, W. R. . **Otimização da Produção de celulose bacteriana utilizando resíduos agroindustriais como fontes de carbono alternativas.** In: X Congresso de Iniciação Científica da Uniara, 2015, Araraquara. X Congresso de Iniciação Científica da Uniara, 2015.

BARROS, F. ; KUHNEN, B. ; SOLCIA, M. C. ; DE AQUINO, RENATA ; **LAZARINI, S. C.** ; LUSTRI, W. R. ; CORBI, P. P. ; RESENDE, F. A. . **Ensaio de mutação gênica reversa para avaliação do complexo metálico de platina com furosemida (Pt-FUR).** In: X Congresso de Iniciação Científica da Uniara, 2015, Araraquara. X Congresso de Iniciação Científica da Uniara, 2015.

SOLCIA, M. C. ; BARROS, F. ; KUHNEN, B. ; AQUINO, R. ; **LAZARINI, S. C.** ; RESENDE, F. A. . **Avaliação da atividade Mutagênica de complexos metálicos com promissoras atividades biológicas.** In: X Congresso de Iniciação Científica da Uniara, 2015, Araraquara. X Congresso de Iniciação Científica da Uniara, 2015.

Sartori, K.P. ; **LAZARINI, S. C.** ; AQUINO, R. ; BARUD, H. S. ; LUSTRI, W. R. ; AMARAL, A. C. . **Viability of the bilayer bacterial cellulose membrane as biological support for use in tissue engineering and regenerative medicine.** In: Experimental Biology, 2015, Boston. Viability of the bilayer bacterial cellulose membranes as a biological support for use in tissue engineering and regenerative medicine, 2015. v. 29.

APRESENTAÇÕES DE TRABALHO E/OU PALESTRA

1. **LAZARINI, SILMARA C.**; BARUD, HERNANE S.; LUSTRI, Wilton Rogério. **Membranas de celulose bacteriana produzidas a partir de meios de cultivo com diferentes fontes de carboidratos para utilização como suporte de liberação sustentada de ceftriaxona.** 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).

2. **LAZARINI, S. C.**; VICENTE, L. M.; MARQUES, W. G; RESENDE, F. A. ; SOLCIA, M. C. ; CORBI, P. P. ; LUSTRI, W. R. **Synthesis, characterization, antibacterial and mutagenic activities, and release capacity in bacterial cellulose membranes of a new Ag(I) complex with chlorthalidone.** 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

3. **LAZARINI, S. C.**; LUSTRI, Wilton Rogério. **Biossíntese de celulose bacteriana e incorporação de fibras alimentares in situ para aplicação como alimento dietético.** 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

4. **LAZARINI, S. C.**; MANÇO, Angélica; LUSTRI, Wilton Rogério ; PEREIRA, Rita de Cassia . **Análise do perfil metabólico do colesterol sob influência de alimentos nas diferentes linhagens de ratos.** 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

DEMAIS PRODUÇÕES

LUSTRI, W. R.; AMARAL, A. C.; **LAZARINI, S. C.**; AQUINO, R. . **Processo de obtenção e utilização de membranas de celulose bacteriana em bicamada, como biocurativo de liberação sustentada de fármacos e suporte para crescimento celular.** 2013, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020130310735, título: "Processo de obtenção e utilização de membranas de celulose bacteriana em bicamada, como biocurativo de liberação sustentada de fármacos e suporte para crescimento celular", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Depositante (s): Wilton Rogério Lustri; Universidade de Araraquara, Depósito: 03/12/2013; Concessão: 03/12/2013.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS

LAZARINI, SILMARA C.; MENEGUIN, A. B.. Participação em banca de Kamila Pena Sartori. **Viabilidade da Membrana de celulose bacteriana como suporte biológico para uso em Engenharia de tecidos e medicina regenerativa.** 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Fisioterapia) - Universidade de Araraquara.

ARAÚJO, A.; LUSTRI, W. R.; **LAZARINI, S. C.**; RESENDE, F. A.. Participação em banca de Amanda Araújo. **Produção de celulose bacteriana utilizando extrato de beterraba e extrato de laranja como fonte de carbono na análise de liberação de fármacos.** 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade de Araraquara.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- 1º Seminário BioPolMat. 2016. (Seminário).
- Como otimizar sua pesquisa através dos ensaios Multiplex. 2016. (Outra).
- I Workshop Análise Térmica: Fundamentos e aplicações. 2016. (Encontro).
- I Workshop de química Inorgânica Medicinal. 2016. (Encontro).
- XVIII BMIC - Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry. 2016. (Encontro).
- Congresso Farmacêutico. Avaliação da atividade mutagênica do complexo metálico Pt-GAB por meio de ensaios de mutação gênica reversa com Salmonella typhimurium. 2015. (Congresso).
- Simpósio de Mutagênese e Oncologia Genética. Evaluation of mutagenicity of metal complex (Au-FUR) by the bacterial reverse mutation test (AMES TEST). 2015. (Seminário).
- Workshop sobre tecnologias tridimensionais. 2015. (Outra).
- X Congresso de Iniciação Científica. Utilização de diferentes composições de meios e variações de condições de cultivo visando a otimização da produção de celulose bacteriana para uso em medicina. 2015. (Congresso).

- 60º congresso Brasileiro de Genética. Evaluation of Mutagenic Activity of metal complex (Ag-Fur) by the Salmonella Microsome Assay. 2014. (Congresso).
- Experimental Biology (EB) Meeting. Physiology - 1180.15. 2014. (Encontro).
- Experimental Biology (EB) Meeting. Pharmacology- 654.8. 2014. (Encontro).
- I international Symposium of Medical Chemistry and Regenerative Medicine. 2014. (Simpósio).

ORIENTAÇÕES

Iniciação Científica

Rafaela Compré Abuchain. **Otimização da Produção de Celulose Bacteriana utilizando resíduos agro-industriais e fontes de carbono alternativas.** 2015. Iniciação Científica. (Graduanda em Biomedicina).

Universidade de Araraquara, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Orientador: Prof. Dr. Wilton Rogério Lustrí

Co-orientadora: Silmara Cristina Lazarini

Dedicatória

Aos meus pais Gilberto e Fatima

Por serem, desde sempre, o maior exemplo que alguém poderia ter e seguir. Por todos os esforços que eles sempre fizeram para que eu pudesse me formar e seguir minha carreira e, mais do que isso, poder hoje passar esse exemplo para minha filha Pietra.

Serei eternamente grata por esse imenso amor e carinho.

A minha irmã Simone

Por todo seu cuidado e preocupação comigo, sempre.

Ao meu esposo Mauricio

Por me incentivar a buscar sempre mais e dividir comigo todos os meus anseios. Por toda paciência quando não podia ficar ao seu lado e me auxiliar ficando com nosso maior tesouro, nossa filha Pietra, para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

A minha filha Pietra

Mesmo tão pequena, sempre me acompanhou nos trabalhos laboratoriais e me fez companhia, algumas vezes na madrugada, enquanto eu escrevia. Por entender meu cansaço, minhas preocupações, às vezes, meu nervosismo. Por ser paciente esperando a mamãe para as brincadeiras.

Você é tudo para mim. Você é minha vida!

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por me conceder a vida todos os dias e com ela a saúde, a força, o discernimento e a proteção.

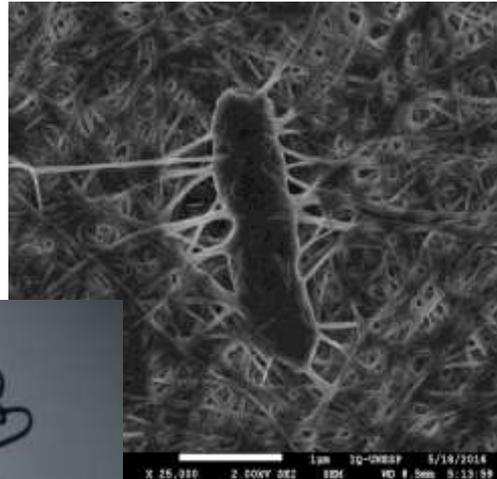
Ao meu Orientador, Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri pela oportunidade que me concedeu em 2009 de iniciar monitorias e acompanhamentos nas suas pesquisas. Desde então, sempre me incentivando, motivando e me orientando. Obrigada por toda experiência e conhecimento transferido no campo da pesquisa e, mais do que isso, obrigada pela amizade formada nesses anos. Minha eterna gratidão.

Aos professores Hernane da Silva Barud, Pedro Paulo Corbi, Eliane Trovatti e Mônica Rosas da Costa Iemma por suas importantes contribuições para o desenvolvimento desse mestrado através de suas co-orientações, sugestões no exame de qualificação, disponibilidade e amizade.

Aos meus amigos do laboratório Quimera, BioPolMat e do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (Mestrado, Doutorado e ICs). Foi um grande prazer fazer parte do convívio de vocês.

A minha amiga Renata de Aquino Carvalho pela amizade, pelos conselhos, pelos desabafos, pelos momentos divertidos e especiais. Por juntas iniciarmos essa loucura e juntas terminarmos, carregando nesse mestrado empregos, casas, filhos e maridos. Conseguimos Rê.

As parcerias e colaborações com o Instituto de Química de Araraquara (Unesp) e a Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).



"Só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos".

Antoine de Saint-Exupéry

Resumo

A celulose é um dos biopolímeros insolúveis em água mais abundantes encontrados na natureza e, embora os vegetais constituam a fonte mais importante desse polímero, ela também pode ser produzida por vários tipos de organismos, incluindo bactérias, especialmente as do gênero *Gluconacetobacter*, principalmente pela espécie *G. hansenii*. Desde a sua descoberta, a celulose bacteriana (CB) demonstrou ser um biopolímero de grande interesse para aplicação em várias áreas industriais e médicas, por ser um biomaterial nanoestruturado de elevada pureza, biocompatível e hipoalergênico. No entanto, existe relativa dificuldade de obtenção de CB, em larga escala, com os meios de cultivo e métodos convencionais devido ao seu baixo rendimento de produção, quer seja em condições estáticas ou em agitação. Portanto, o estudo de novos métodos e condições de cultivo que permitam uma produção em larga escala e com menor custo possível se torna de extrema importância. Embora existam vários relatos na literatura da utilização de CB como sistemas de carreamento e liberação controlada de fármacos, a descrição de seu uso como suporte para carreamento e liberação de complexos metálicos é raro. Assim, o presente trabalho foi desenvolvido com os objetivos de utilizar diferentes composições de meios de cultivo, determinar a melhor densidade óptica (DO) para produção de CB, selecionar variantes da espécie *G. hansenii* ATCC 23769, por aplicações de pressões seletivas química (variações de pH) e físicas (variações de temperatura e tempo de exposição à luz ultravioleta) para otimização da produção desse biopolímero, a análise do rendimento de produção, em massa seca das membranas obtidas, além de sua aplicação como sistema carreador e de liberação do antibiótico ceftriaxona (CRO) e do complexo metálico Ag(I) com clortalidona (Ag-CLR). Constituíram também objetivos desse trabalho a caracterização estrutural das membranas de CB obtidas, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR), difração de RaioX (DRX) e a análise morfológica das variantes fenotípicas de *G. hansenii*, obtidas após aplicação das pressões seletivas, por MEV. Os resultados obtidos sugerem que o rendimento de produção de CB em massa seca e a melhor DO para sua produção são diretamente dependentes das fontes de carbono utilizadas. Também foi observado que as membranas de CB produzidas nos meios constituídos por monossacarídeos e dissacarídeos, como fontes de carbono, apresentaram melhores resultados como dispositivos de liberação sustentada de CRO e Ag-CLR. Após a aplicação das pressões seletivas química e físicas, foram selecionadas variantes fenotípicas de *G. hansenii* que apresentaram diferenças no potencial de produção e rendimento em massa seca das membranas de CB, e a caracterização, por MEV, permitiu a observação de variantes morfológicas, entre as unidades formadoras de colônias (UFC), bem como diferenças na disposição e espessura das fibras das membranas produzidas por essas variantes. Esses resultados demonstraram que o rendimento da produção de CB e a melhor DO estão diretamente relacionados com a composição do meio de cultivo, a qual pode promover ativação diferencial de vias metabólicas basal para a produção de CB. Foi observado que as diferentes variantes fenotípicas, obtidas após aplicações das pressões seletivas, também apresentaram ativação diferencial nas rotas metabólicas basal e de síntese de CB. Os ensaios de liberação de CRO e Ag-CLR, utilizando a CB produzida nos meios contendo monossacarídeos e dissacarídeos, demonstram o grande potencial dessas membranas para aplicação como suporte para liberação sustentada de fármacos.

Palavras chave: Celulose bacteriana, meios de cultivo, pressões seletivas, rendimento de produção, suporte para liberação sustentada de fármacos.

Abstract

Cellulose is one of the most abundant water-insoluble biopolymers found in nature and although plants are the most important source of this polymer, it can also be produced by various types of organisms, including bacteria, especially those of the genus *Gluconacetobacter*, mainly by the species *G. hansenii*. Since its discovery, bacterial cellulose (BC) has shown to be a biopolymer of great interest for application in several industrial and medical areas, because it is a nanostructured biomaterial with high purity, biocompatible and hypoallergenic. However, there is a relative difficulty in obtaining BC, on a large scale, with the culture media and conventional methods due to its low production yield, either under static or agitated conditions. Therefore, studies of new cultivation methods and conditions that allow large-scale production and with the lowest possible cost becomes extremely important. Although there are several reports in the literature of the use of BC as carrier systems and controlled release of drugs, the description of its use as a carrier for the loading and release of metal complexes is rare. Thus, the present work was developed with the aim of using different compositions of culture media, to determine the best optical density (OD) for BC production, to select variants of the species *G. hansenii* ATCC 23769, by selective pressure applications (temperature, pH and time of exposure to ultraviolet light) to optimize the production of this biopolymer, the analysis of the production yield, dry mass of the membranes obtained, as well as its application as carrier system and sustained release antibiotic ceftriaxone (CRO) and the metal complex Ag(I) with chlorthalidone (Ag-CLR). The structural characterization of BC membranes was obtained by Scanning Electron Microscopy (SEM), Infrared Spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction (XRD) and morphological analysis of the phenotypic variants of *G. hansenii*, obtained after the application of selective pressures. The results obtained suggest that the production yield of BC in dry mass and the best OD for its production are directly dependent on the carbon sources used. It was also observed that the BC membranes produced in the culture medium containing monosaccharides and disaccharides, as carbon sources, in their composition, presented better results as sustained release devices of CRO and Ag-CLR. After application of chemical and physical selective pressures, phenotypic variants of *G. hansenii* were selected that showed differences in the production potential and dry mass yield of the BC membranes, and the characterization by SEM allowed the observation of morphological variants between colony forming units (CFU), as well as differences in the fiber arrangement and thickness of the membranes produced by these variants. These results showed that the yield of BC production and the best OD are directly related to the composition of the culture medium, which can promote differential activation of basal metabolic pathways to produce BC. It was observed that the different phenotypic variants, obtained after selective pressure applications, also presented differential activation in basal metabolic routes and BC synthesis. The CRO and Ag-CLR release assays, using the BC produced in the media containing monosaccharides and disaccharides, demonstrate the great potential of these membranes for application as support for sustained release of drugs.

Key words: Bacterial cellulose, culture media, selective pressures, production yield, support for sustained release of drugs.

Lista de Figuras

Figura 1 - Unidades de β -D-glicopirranose-----	4
Figura 2 - Estrutura da celulose. As linhas pontilhadas esquematizam as ligações de hidrogênio possíveis e a seta, a ligação β -(1 \rightarrow 4)-----	5
Figura 3 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV 5000X) de membrana de CB liofilizada-----	8
Figura 4: Modelo hipotético de via metabólica para a biossíntese de celulose bacteriana por <i>G.hanseni</i> -----	11
Figura 5- Membrana de CB produzida em cultivo estático-----	12
Figura 6- Produção de esferas de CB em cultivo agitado-----	13
Figura 7- Membranas de CB produzidas por <i>G. hansenii</i> ATCC 23769. Painel A apresenta CB produzida em meio FRU a 21°C. Painel B apresenta CB produzida em meio FRU a 35°C. Ambas em cultivo estático por 7 dias-----	30
Figura 8- Membranas de CB produzidas nos diferentes meios de cultivo. Painel A - membrana de CB produzida no Meio de cultivo Y; Painel B – membrana de CB produzida no Meio de cultivo Z; Painel C - membrana de CB produzida no Meio de cultivo HS; Painel D - membrana de CB produzida no Meio de cultivo FRU; Painel E – membrana de CB produzida no Meio de cultivo MS1 e Painel F – membrana de CB produzida no meio de cultivo MS2-----	31
Figura 9- Comparação entre fontes de carbono e pH dos diferentes meios de cultivo após 7 dias de incubação, em B.O.D. a 28°C-----	32
Figura 10- Imagens de MEV das membranas produzidas nos diferentes meios de cultivo MS1, MS2, FRU, HS, Y e Z-----	34

Figura 11 – Espectros de FTIR das membranas de CB produzidas nos diferentes meios de cultivo-----	35
Figura 12- Membranas de CB produzidas em diferentes meios de cultivo (MS1, MS2, FRU e HS) com diferentes DO. Painel A: produção na DO 1; Painel B: produção na DO 2; Painel C: produção na DO 4; Painel D: produção na DO 5; Painel E: produção na DO 7 e Painel F: produção na DO 10-----	36
Figura 13 - Teste de difusão em discos de CB e os halos de inibição para o antibiótico CRO-----	40
Figura 14 – Teste de difusão em discos de CB e os halos de inibição para o complexo Ag-CLR-----	41
Figura 15- Cultivo de <i>G. hansenii</i> - Painel A: Cultivo estático, a 28°C em B.O.D. por 3 dias em meio FRU, na fase logarítmica de crescimento. Painel B: Colônias isoladas com as mesmas características fenotípicas macroscópica, demonstrando a pureza do cultivo, utilizadas para a produção do pré-inóculo-----	43
Figura 16- Características fenotípicas macroscópicas de colônias selecionadas após aplicação das pressões seletivas. As setas apontam os diferentes tipos de colônias isoladas em exposição à UV por 5 minutos (Painel A), UV 10 minutos (Painel B), UV 30 minutos (Painel C)-----	44
Figura 17- Características fenotípicas macroscópicas de colônias selecionadas após aplicação das pressões seletivas. As setas apontam os diferentes tipos de colônias isoladas em temperatura 20°C (Painel A), 25°C (Painel B), 28°C (Painel C) e 35°C (Painel D)-----	45
Figura 18- Características fenotípicas macroscópicas de colônias selecionadas após aplicação das pressões seletivas. As setas apontam os diferentes tipos de colônias isoladas após cultivo em pH 3,0 (Painel A), 4,5 (Painel B), 7,0 (Painel C) e 10,0 (Painel D)-----	46

Figura 19 - Resultado do cultivo das diferentes membranas de CB produzidas a partir de colônias produzidas após pressão seletiva em diferentes temperaturas. Paineis A: produção de CB por uma colônia isolada após cultivo a 20°C; Paineis B, C e D: produção de CB por três colônias isoladas após cultivo a 25°C; Paineis E e F: produção de CB por duas colônias isoladas após cultivo a 28°C; Paineis G, H e I: produção de CB por três colônias isoladas após cultivo a 35°C-----48

Figura 20 - Resultado do cultivo das diferentes membranas de CB produzidas a partir de colônias após pressão seletiva em diferentes tempos de exposição à UV. Paineis A: produção de CB por uma colônia isolada após 5 min exposição; Paineis B e C: produção de CB por duas colônias diferentes isoladas após 10 min exposição; Paineis D: produção de CB por uma colônia isolada após 30 min exposição-----49

Figura 21 - Resultado do cultivo das diferentes membranas de CB produzidas a partir de colônias produzidas após pressão seletiva em diferentes valores de pH . Paineis A: produção de CB por uma colônia isolada após cultivo em meio de pH 3,0; Paineis B: produção de CB por uma colônia isolada após cultivo em meio de pH 4,5; Paineis C: produção de CB por uma colônia isolada após cultivo em meio de pH 7,0; Paineis D: produção de CB por uma colônia isolada após cultivo em meio de pH 10,0-----50

Figura 22- MEV das membranas de CB analisando a morfologia bacteriana após aplicação da pressão seletiva de temperatura. Paineis A (20°C), Paineis B (25°C), Paineis C (28°C) e Paineis D (35°C)-----55

Figura 23- MEV das membranas de CB analisando as diferenças de tramas após aplicação da pressão seletiva de temperatura. Paineis A (20°C), Paineis B (25°C), Paineis C (28°C) e Paineis D (35°C)-----56

Figura 24- MEV das membranas de CB analisando a morfologia bacteriana após aplicação da pressão seletiva em pH. Paineis A (pH 3,0), Paineis B (pH 4,5), Paineis C (pH 7,0) e Paineis D (pH 10,0)-----57

Figura 25. MEV das membranas de CB analisando as diferenças de tramas após aplicação da pressão seletiva de pH. Painel A (pH 3,0), Painel B (pH 4,5), Painel C (pH 7,0) e Painel D (pH 10,0)-----58

Figura 26- MEV das membranas de CB analisando a morfologia bacteriana após aplicação da pressão seletiva em exposição à luz UV. Painel A (5 min.), Painel B (10 min.) e Painel C (30 min.)-----59

Figura 27- MEV das membranas de CB analisando as diferenças de tramas após aplicação da pressão seletiva em exposição à luz UV. Painel A (5 min.), Painel B (10 min.) e Painel C (30 min.)-----60

Figura 28 - Espectro FTIR: (Painel A) e difratogramas de raiosX (Painel B) das membranas de CB produzidas após aplicações das diferentes pressões seletivas (pH 10, temperatura de 35° C e 10 min de exposição à luz UV)-----61

Lista de Tabelas

Tabela 1- Aplicações da CB-----	16
Tabela 2- Composição dos meios de cultivo em g/L-----	23
Tabela 3 - Relação das pressões seletivas as quais serão submetidos os cultivos de <i>G. hansenii</i> (ATCC 23769)-----	27
Tabela 4- Rendimento em massa seca das membranas de CB produzidas nos diferentes meios de cultivo-----	33
Tabela 5- Rendimento em massa seca das membranas de CB produzidas nos diferentes meios de cultivo e nas diferentes DO-----	37
Tabela 6- Medida dos halos de inibição ao redor dos discos de CB produzidas em diferentes meios (MS1, MS2 e FRU)-----	39
Tabela 7 - R_{MS} das membranas de CB produzidas pelas colônias obtidas após a aplicação das pressões seletivas em diferentes temperaturas-----	51
Tabela 8- R_{MS} das membranas de CB produzidas pelas colônias obtidas após a aplicação das pressões seletivas em diferentes tempos de exposição a luz UV-----	52
Tabela 9. R_{MS} das membranas de CB produzidas pelas colônias obtidas após a aplicação das pressões seletivas em diferentes pH-----	52

Lista de Abreviaturas e siglas

$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ – Sulfato de amônio

Ag – Prata

Ag-CLR – Complexo de prata com clortalidona

AgNO_3 – Nitrato de prata

ATP – Adenosina Trifosfato

B.O.D. – Demanda Bioquímica de Oxigênio

CB – Celulose bacteriana

CLR- Clortalidona

CRO – Ceftriaxona

CV – Celulose vegetal

DO – Densidade óptica

DRX- Difração de RaioX

FRU – Meio de cultivo contendo frutose

FT-IR – Espectroscopia no Infravermelho transformada de Fourier

G – *Gluconacetobacter*

HS – Meio de cultivo proposto por Hestrin & Schramm

K_2HPO_4 – Fosfato de potássio dibásico

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Sulfato de magnésio pentahidratado

MH – Meio de cultivo Muller Hinton

MS1 – Meio de cultivo sintético 1

MS2 – Meio cultivo sintético 2

Na_2HPO_4 – Fosfato de sódio dibásico

NaOH – Hidróxido de sódio

R_{MS} - Rendimento de Produção em Massa Seca

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

UDP – Uridina difosfato

UDPG – Uridina difosfato glicose

UFC – Unidade formadora de colônia

UV – Exposição à luz ultravioleta

Y – Meio de cultivo proposto por Yamanaka

Z – Meio de cultivo proposto por Zhou

Lista de expressões

Expressão (1)- Rendimento de Produção em Massa Seca (R_{MS})-----24

Sumário

1. Introdução.....	4
2. Revisão bibliográfica	7
2.1. Espécies bacterianas produtoras de celulose.....	7
2.2. Celulose bacteriana (CB)	8
CAPÍTULO 2	18
1. Objetivos	19
1.1. Objetivos Gerais.....	19
1.2. Objetivos Específicos	19
CAPÍTULO 3	21
1. Materiais	22
2. Métodos.....	22
2.1. Preparo dos diferentes meios de cultivo utilizados na produção de CB.....	22
2.2. Reativação da cepa de <i>G. hansenii</i> (ATCC 23769).....	23
2.3. Preparo do pré-inóculo de <i>G. hansenii</i> (ATCC 23769).	23
2.4. Produção das membranas de CB nos diferentes meios de cultivo.....	24
2.5. Caracterização das membranas de CB produzidas nos diferentes meios de cultivo.....	25
2.6. Determinação da melhor densidade óptica e análise de rendimento em massa seca na produção de membranas de CB.....	25
2.7. Síntese do complexo metálico prata (I) com clortalidona (Ag-CLR).....	26
2.8. Avaliação da capacidade de retenção e liberação sustentada de ceftriaxona e do complexo Ag-CLR pelas membranas de CB.....	26
2.9. Aplicação de pressões seletivas em cultivo de <i>G. hansenii</i> (ATCC 23769).....	27
2.10. Produção de membranas de CB a partir das colônias obtidas após pressão seletiva e rendimento em massa seca.	28
2.11. Caracterização das membranas de CB e das variantes fenotípicas de <i>G. hansenii</i> ATCC 23769, obtidas após pressões seletivas.	29
CAPÍTULO 4	30
1. Resultados e Discussão	31
1.1. Reativação da cepa de <i>G. hansenii</i> (ATCC 23769).....	31
1.2. Produção de celulose por <i>G. hansenii</i> (ATCC 23769) nas temperaturas de 21°C e 35°C....	31
1.3. Produção das membranas de CB nos diferentes meios de cultivo e rendimento em massa seca.....	32
1.4. Caracterização físico-química das membranas de CB produzidas nos diferentes meios	35

1.5. Determinação da melhor densidade óptica e análise de rendimento em massa seca na produção de membranas de CB.....	37
1.6. Análise da capacidade de retenção e potencial liberação sustentada de CRO e do complexo metálico Ag-CLR pelas membranas de CB que apresentaram melhor rendimento em massa seca.....	39
1.7. Aplicação de pressões seletivas em cultivo de <i>G. hansenii</i> (ATCC 23769).....	43
1.8. Produção de membranas de CB a partir das colônias obtidas após pressão seletiva.	48
1.9. Análise comparativa do rendimento em massa seca das membranas produzidas pelas colônias selecionadas após aplicação das pressões seletivas.....	52
1.10. Caracterização das membranas de CB e variantes fenotípicas de <i>G. hansenii</i> , por MEV após pressões seletivas.	54
1.11. Caracterização das membranas de CB por FTIR e DRX após pressões seletivas.....	61
CAPÍTULO 5	63
1. Conclusões.....	64
2. Perspectivas	65
Referências Bibliográficas	66

1. Introdução

A celulose é um dos biopolímeros insolúveis em água mais abundantes encontrados na natureza (Brown, 2004) e, embora os vegetais constituam a fonte mais importante, com produção estimada de 10^{10} a 10^{11} toneladas/ano (Ummartyotin & Manuspiya 2014), esse polímero pode ser produzido por vários tipos de organismos vivos (bactérias, fungos e algas) (Lazarini et al., 2016; Donini et al. 2010; Klemm et al., 2005). A celulose derivada de vegetais (CV) encontra-se associada a outros tipos de biomoléculas, como lignina e hemiceluloses, enquanto a celulose bacteriana (CB) é isenta delas. A CV e a CB são constituídas por um homopolímero natural (poli β -(1 \rightarrow 4)-D-glicose) linear com estrutura constituída por unidades de β -D-glicopirranose (Figura 1) unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4). Entretanto, a CB apresenta propriedades físico-químicas e mecânicas diferenciais, em relação à CV, incluindo maior índice de cristalinidade, maior grau de polimerização, maior capacidade de retenção de água e permeabilidade ao oxigênio (Dahman et al., 2010; Donini et al. 2010).

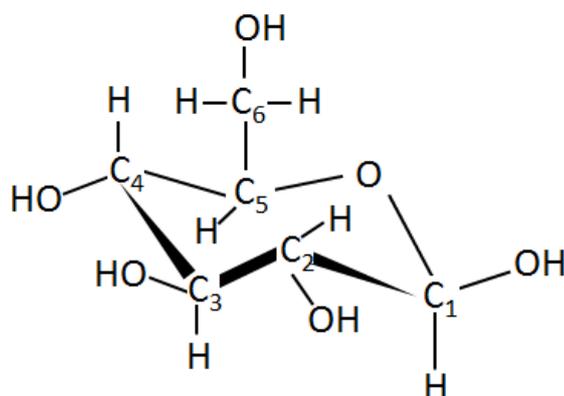


Figura 1 - Unidades de β -D-glicopirranose

A formação de fibras de celulose é devida à ocorrência de ligações de hidrogênio, que são responsáveis pela consistente associação entre os polímeros lineares formados. Moléculas de celulose formam ligações de hidrogênio intracadeias, entre grupos hidroxila da mesma molécula e intercadeias, entre grupos hidroxilas de cadeias adjacentes (Figura 2). O primeiro tipo de interação é responsável pela rigidez da cadeia e o segundo pela formação da fibra (Lustri et al., 2015; Pietak et al., 2007)

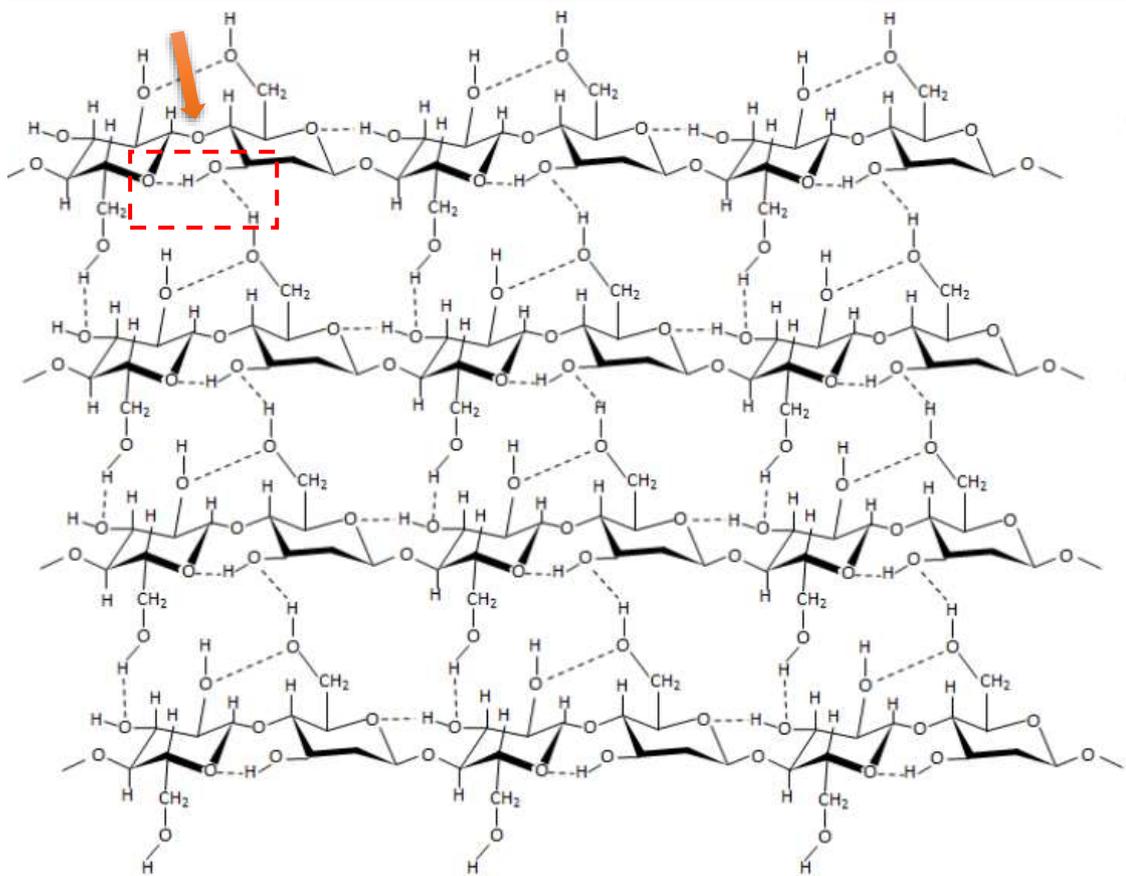


Figura 2 - Estrutura da celulose. As linhas pontilhadas esquematizam as ligações de hidrogênio possíveis e a seta, a ligação β -(1 \rightarrow 4) (modificada de Lustrì et al., 2015).

A celulose pode ser produzida por várias espécies tais como vegetais, algumas espécies de micro-organismos, por síntese enzimática ou por síntese química (Einfeldt et al., 2005; Machado et al., 2016). Um destaque especial tem-se dado à celulose produzida por bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, especialmente pelas espécies *G. xylinus* e *G. hansenii*, utilizando uma variedade de meios de cultivo naturais e sintéticos, com diferentes fontes de carbono (Lazarini et al., 2016; Lustrì et al., 2015; Shah et al., 2013a).

Devido à elevada pureza e às propriedades físico-químicas da CB, o polímero oferece uma variedade de aplicações potenciais, como por exemplo, na medicina (Lustrì et al., 2015). O fato da membrana úmida de CB ser um material altamente poroso e de grande área superficial, sendo considerada como uma matriz ideal para a incorporação de compostos orgânicos e inorgânicos (Barud et al., 2008; de Oliveira Barud et al., 2016), faz com que possa ser utilizada como carreador de antibióticos e outros fármacos, também

servindo como barreira física às infecções por patógenos bacterianos (Lustri et al., 2015; de Oliveira Barud et al., 2016).

Embora existam vários relatos de utilização de CB como sistemas de carreamento e liberação controlada de fármacos (Wei et al., 2011; Jung, Jeong, et al., 2010; Barud et al., 2011; Trovatti et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Lustri et al., 2015; Lazarini et al., 2016), a descrição de seu uso como suporte para carreamento e liberação de complexos metálicos é rara.

Dessa forma, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de utilizar diferentes composições de meios e variar as condições de cultivo, através de pressões seletivas química (variações de pH) e físicas (variações de temperatura e tempo de exposição à luz ultravioleta), visando a seleção de variantes da espécie *G. hansenii* ATCC 23769 para otimização da produção de CB, além da caracterização estrutural dessas membranas (Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR), e difração de RaioX (DRX), análise morfológica dos microorganismos por MEV análise do rendimento de produção da membranas de CB, bem como aplicação como sistema de liberação de fármacos e/ou complexos metálicos.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Espécies bacterianas produtoras de celulose

Há algum tempo, tem se dado a atenção a espécies bacterianas produtoras de celulose devido às características peculiares dos micro-organismos com essa habilidade, que permitem um rígido controle dos parâmetros de cultivo, como pH, temperatura, coeficiente de aeração, velocidade de agitação, tempo de cultivo e composição do meio, além de minimizar os danos produzidos ao ambiente quando comparada com a utilização da CV. (Souza & Garcia-Cruz, 2004). Essa produção pode ser realizada por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, algas e fungos e pode ser desenvolvida em laboratório, utilizando os mais diversos substratos como glicose, frutose, sacarose, lactose, amido hidrolisado, metanol, entre outros, sendo o custo de produção dependente destes substratos (Paul et al., 1986).

Dentre as principais bactérias produtoras de celulose destacam-se as do gênero *Acetobacter* (atualmente *Gluconacetobacter*), *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* e *Sarcina*. Bactérias pertencentes ao gênero *Gluconobacter*, se destacam na produção de CB. Este gênero é constituído por bactérias que possuem forma de bastonetes, são Gram-negativas, não formam endósporos, e são aeróbicas obrigatórias. Produzem, em meios de cultivos sólidos, colônias opacas, tendo sua temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30°C, e o pH ótimo em torno de 5,5. Bioquimicamente, as bactérias pertencentes a esse gênero são catalase positivas, e negativas para oxidase, não reduzem nitrato a nitrito, não produzem indol ou H₂S. São quimiorganotróficas e oxidam etanol a ácido acético. Não oxidam acetato ou lactato a CO₂ e H₂O (Delmer, 1987; Siqueira et al., 2009; Donini et al., 2010; Oliveira & Junior, 2010).

Descrita por Adrian Brown, em 1886 (Jonas & Farah, 1998; Abeer et al., 2014) a espécie *G. hansenii* (anteriormente denominada *G. xylinus*) produz celulose na forma de filme na interface superfície-ar em meio de cultura líquido, sob condições estáticas, além de produzir ácido acético na presença de oxigênio. Após vários estudos, pesquisadores observaram que o filme de CB constitui uma barreira contra radiação ultravioleta e seu potencial de hidratação mantém o ambiente propício para crescimento e manutenção da viabilidade bacteriana (Williamst & Cannon, 1989; Donini et al., 2010; Abeer et al., 2014).

2.2. Celulose bacteriana (CB)

2.2.1. Estrutura da CB

A espécie *G. hansenii* produz e secreta a celulose (Figura 3) agregando as microfibrilas na interface ar-líquido do meio de cultivo, utilizando fontes de carbono e nitrogênio para sua produção. A unidade estrutural de repetições da molécula de celulose é a celobiose, formada pela união de duas moléculas de glicose (Saxena & Brown, 1995). Quanto à sua morfologia, o diâmetro das fibras da CB é de 1/100 quando comparada à CV, e o módulo de Young (parâmetro mecânico que proporciona medida da rigidez de um material sólido) da celulose é equivalente a do alumínio (Eichhorn & Young, 2001). Diferente da CV, que necessita de tratamento para a extração de lignina e hemicelulose, as fibras de CB são formadas por uma matriz hidrofílica, e que não necessita de tratamento devido interações intermoleculares geradas entre as cadeias, e as interações intramoleculares, que por sua vez garantem a pureza e rigidez da estrutura e apresentando elevada hidrofiliçidade (Chawla et al., 2009; Czaja et al., 2006).

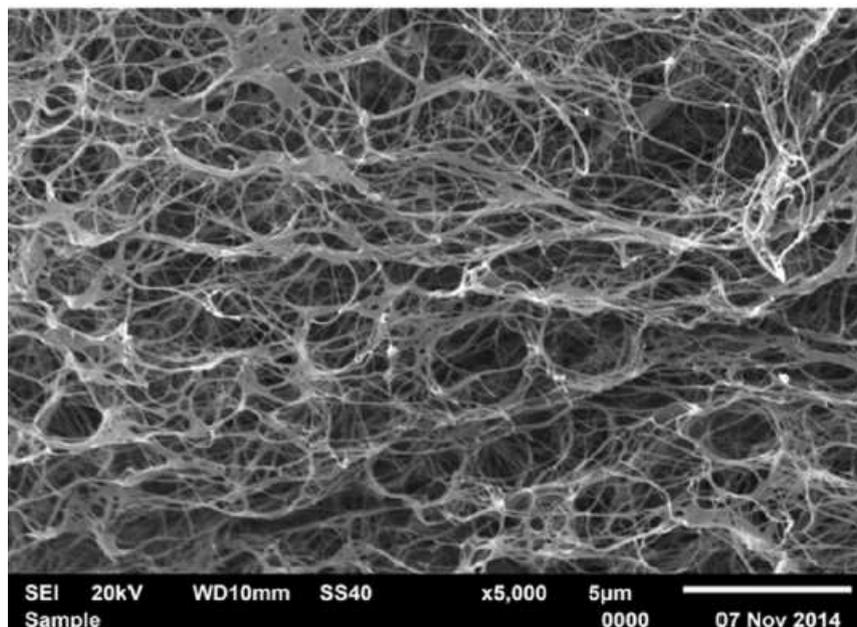


Figura 3 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV 5000X) de membrana de CB liofilizada (Lazarini et al., 2016).

2.2.2. Propriedades da CB

As membranas de CB apresentam propriedades como cristalinidade (60-90%) devido à natureza linear e conformacionalmente homogênea do polímero e à extensa

ligação intermolecular de hidrogênio entre as cadeias adjacentes (Dugan et al., 2013), força de tensão, elasticidade e alta resistência mecânica, biodegradabilidade, além de ser atóxica e hipoalergênica (Jonas & Farah, 1998; Czaja et al., 2006; Lustri et al., 2015; Lazarini et al., 2016). As membranas hidratadas de CB apresentam elevada capacidade de adsorção de diferentes espécies iônicas, moleculares ou até mesmo a estabilização de partículas, pois apresentam uma estrutura altamente hidratada de fibras nanométricas formadas por um sistema poroso. Essa estrutura tem favorecido a utilização da CB como agente de reforço, como molde, na preparação de copolímeros e na formação de redes interpenetradas com elevado grau de entrecruzamento (Eichhorn et al., 2010; Iguchi et al., 2000).

Desde a sua descoberta, a CB demonstrou ser um biopolímero de grande interesse para aplicação em várias áreas industriais e médicas, devido às suas características estruturais, as quais demonstram ser vantajosas, em relação à CV (Lazarini et al., 2016; Lustri et al., 2015; Ul-Islam et al., 2012), sendo dada atenção especial principalmente na exploração de novos curativos que possam auxiliar na cicatrização de ferimentos e na substituição temporária da pele em queimaduras e úlceras, componentes de implantes dentários e vasos sanguíneos artificiais para microcirurgias (Lustri et al., 2015), como sistemas de carreamento e liberação de fármacos, implantes médicos e para a engenharia de tecidos (de Oliveira Barud et al., 2016)

2.2.3. Bioquímica da produção de CB

A biossíntese da CB consiste em um processo complexo, pois é dependente da polimerização de resíduos de glicose da cadeia (Figura 1) seguida pela secreção extracelular das cadeias que terminam em arranjo linear com a cristalização das cadeias de hidrogênio por ligações por forças de Van Der Waals. (Ross et al., 1991). A CB gerada pela espécie *G. hansenii* apresenta características especiais podendo dar origem a duas formas de celulose. Se as micro-fibrilas estiverem orientadas em arranjo paralelo apresenta a síntese da celulose tipo I, se esta disposição for antiparalela a síntese será da celulose tipo II (Pacheco et al., 2004). O gênero *Gluconacetobacter* não é capaz de metabolizar a glicose por via anaeróbia devido à falta da enzima responsável por catalisar a reação de fosforilação de frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bifosfato (a fosfofrutoquinase-1) que impede a ocorrência da via fermentativa. Dessa forma, a síntese da CB ocorre pela via das hexoses e gliconeogênese (Figura 4). A conversão da glicose, transportada do

ambiente externo para o citoplasma, é catalisada por quatro enzimas bacterianas: a glicoquinase (enzima responsável pela fosforilação do carbono 6 da glicose obtendo glicos-6-fosfato), a fosfoglicomutase (enzima que catalisa a reação de isomerização da glicose-6-fosfato a glicose-1-fosfato), a UDPG-pirofosforilase (responsável pela síntese da UDP-glicose (UDPG) e a celulose sintase (responsável pela polimerização da celulose a partir da UDP-glicose) (Lustri et al., 2015). Pela via endógena (gliconeogênese) a síntese começa a partir das fontes como oxaloacetato em piruvato pela ação da enzima carboxilase do piruvato. A transformação do piruvato em fosfoenolpiruvato é produzida pela ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase, consumindo cerca de 10% do ATP. Assim, a energia empregada para a síntese da CB vem do metabolismo aeróbio (Ross et al., 1991; Czaja et al., 2006; Donini et al., 2010; Lustri et al., 2015).

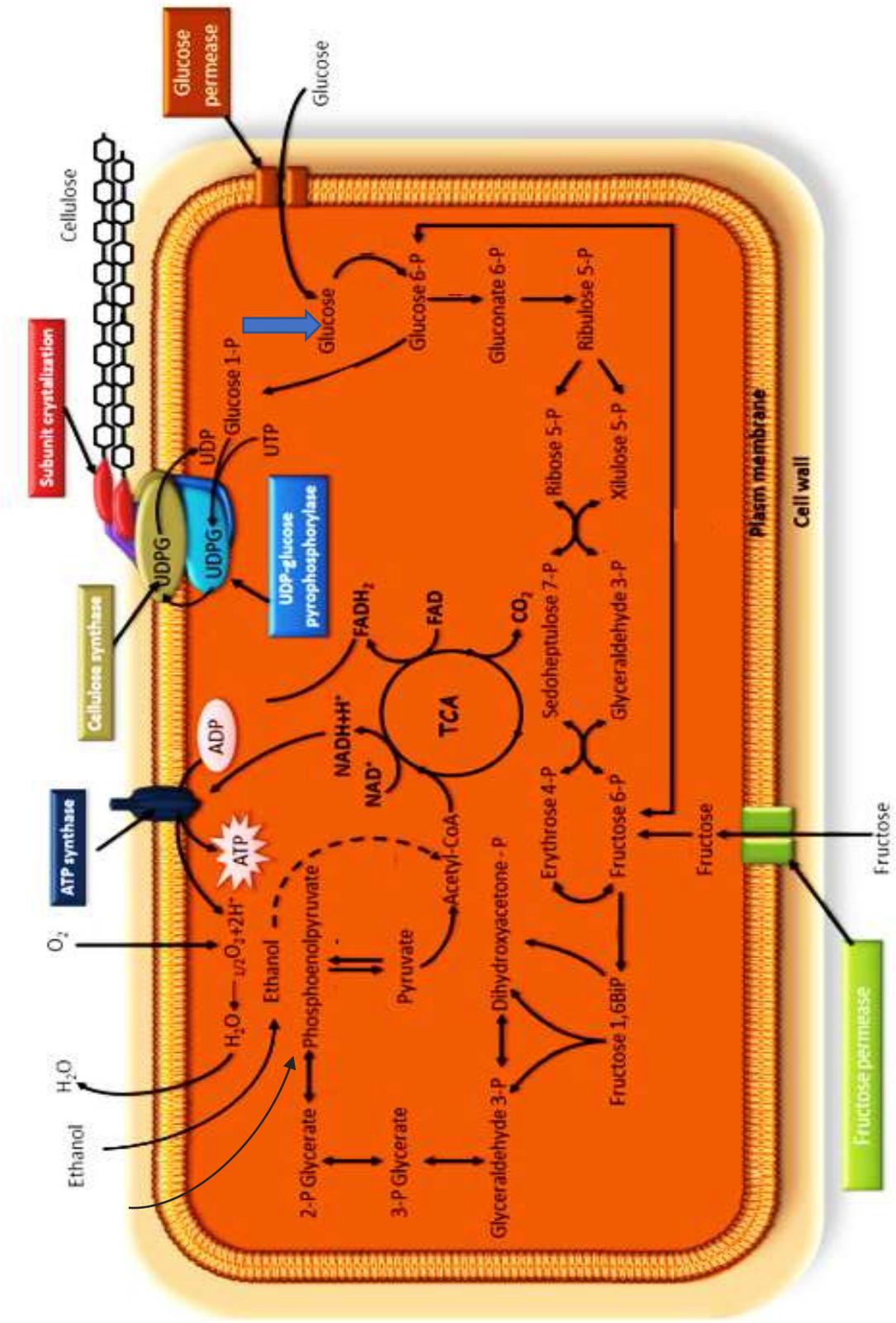


Figura 4: Modelo hipotético de via metabólica para a biossíntese de celulose bacteriana por *G. hansenii* (adaptada de Lustrì et al., 2015).

No entanto, existe relativa dificuldade de obtenção de CB em larga escala com os meios de cultivo e métodos convencionais devido ao seu baixo rendimento de produção, quer seja em condições estáticas ou em agitação. Assim, o estudo de novos métodos e condições de cultivo que permitam uma produção em larga escala e com menor custo possível se torna de extrema importância (Ruka et al., 2012).

2.2.4. Síntese de CB em cultivo estático

Como relatado, em cultivo estático, tradicionalmente, a CB é produzida formando um filme na interface ar- meio de cultivo, o qual é incubado durante vários dias até que uma membrana seja formada, ocupando toda superfície do meio, se moldando ao formato do frasco de cultivo (Figura5). A CB produzida apresenta superfície mais densa do lado exposto ao ar (Iguchi et al., 2000).

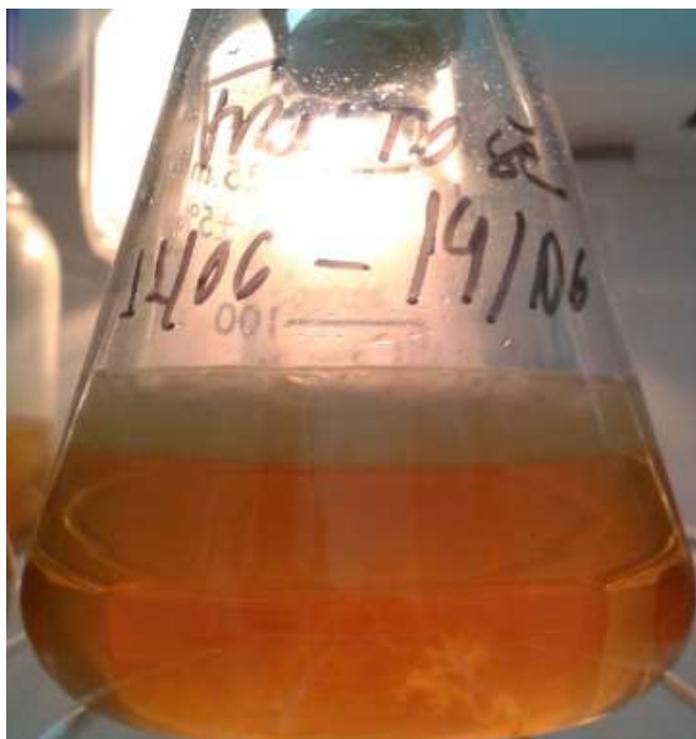


Figura 5. Membrana de CB produzida em cultivo estático (Fonte: próprio autor)

Hestrim e Schramm (1954) conduziram experimento para estabelecer as condições ideais para a produção de CB em cultivo estático, utilizando glicose como fonte de carbono.

Borzani e de Souza (1995) consideraram, em seus estudos, que são formadas várias camadas finas de celulose paralelamente à superfície do meio de cultivo, confirmando o descrito por Fontana (1990) e que a camada recém-produzida sempre se encontra na interface meio/ar sugerindo que os nutrientes se difundem através das camadas de CB mais internas até as células bacterianas mais ativas na síntese, que se encontram próximas a interface meio/ar (Fontana et al., 1990; Borzani & de Souza, 1995).

Embora a produção de celulose bacteriana em cultivo estático seja muito simples, existem inconvenientes que impedem o controle de parâmetros para melhorar o rendimento, pois como a membrana é formada na interface meio/ar, movimentações podem interferir na continuidade do processo de síntese (Recouvreur, 2008).

2.2.5. Síntese de CB em cultivo agitado

Em cultivo agitado, frascos contendo inóculo bacteriano são levados para agitadores orbitais (Figura 6). A celulose é produzida sob a forma de corpos esféricos, estrelados ou filamentosos com diâmetro variável e o rendimento é bem menor do que a aquele obtido em cultivo estático (Recouvreur, 2008).

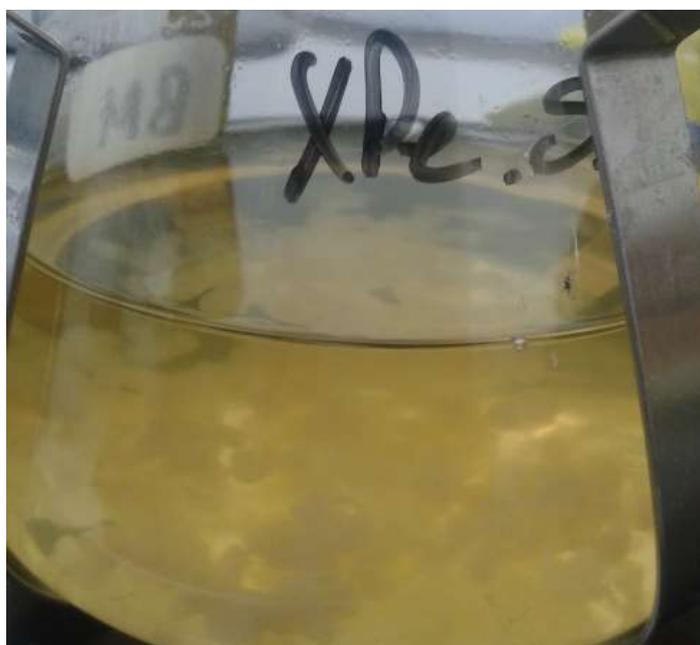


Figura 6: produção de esferas de CB em cultivo agitado (Fonte: próprio autor).

Estudos de Hestrin e Schramm (1954) 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 & Schramm 1954; Jung, Lee, et al., 2010). Esses mesmos autores relatam que a adição de etanol ao meio de cultivo evita produção de mutantes espontâneos.

2.2.6. Influência do pH e temperatura na produção de CB

A espécie *G. hansenii* produz, como metabólitos, durante a síntese de CB, ácido glucônico e acético (Jung, Jeong, et al., 2010). Jonas e Farah (Jonas & Farah 1998) relataram que as empresas que produzem CB, para uso biomédico, trabalham com valores de pH entre 4 e 4,5 para evitar contaminação do meio durante o cultivo com outros microorganismos (Jonas & Farah, 1998). Entretanto Jung e colaboradores (Jung, Jeong, et al., 2010) mostraram que uma maior produção de CB foi em pH 6,5

Em relação à temperatura para síntese de CB, Son e colaboradores (Son et al. 2001) estudaram o efeito na produtividade da bactéria *Acetobacter sp. A9* para valores entre 20°C e 40°C. O melhor valor encontrado pelo grupo foi de 30°C concluindo que a temperatura afeta não só a produtividade, como também a morfologia e a estrutura cristalina do polímero final. Hirai e colaboradores (Hirai et al., 1997) mostraram que a CB produzida pela bactéria *A. hansenii* ATCC 23769 em meio HS a 40°C era formada por bandas de celulose II, ao passo que o polímero produzido em 28°C levou à uma morfologia formada por tiras de celulose I.

2.2.7. Fontes de carbono na produção de CB

As fontes de carbono também são fatores importantes para a produção de CB e afetam o rendimento de produção. Os monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos, ácidos orgânicos e álcoois foram os mais estudados, segundo relatos da literatura (Phisalaphong & Jatupaiboon, 2008). Jonas e Farah (Jonas & Farah, 1998) compararam o efeito da fonte de carbono sobre o rendimento de CB utilizando diversas fontes de carbono (monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos), álcoois (etanol, glicerol e etilenoglicol), ácidos orgânicos (citrato, succinato e gliconato) e outros compostos e

relataram um aumento na produção de CB de 6,2 e 3,8 vezes, respectivamente, quando utilizaram o D-arabitol e o D-manitol em comparação com a glicose.

A identificação de fontes de nutrientes de baixo custo, economicamente viáveis para a produção de CB, constitui um dos desafios para as pesquisas científicas. Existem vários relatos na literatura de diferentes meios de cultivo, bem como variadas fontes de carbono (Mohammadkazemi et al., 2015; Ruka et al., 2013; Shah et al., 2010; Lazarini et al., 2016). Vários pesquisadores demonstraram, utilizando fontes de carbono diversificadas, produção significativa de CB a partir de resíduos de caldo de fermentação de cerveja (Ha et al., 2011), resíduos agrícolas (Kongruang, 2008), melão e xarope de cana-de-açúcar (Bae & Shoda, 2005; Lazarini et al., 2016), sucos de frutas (Kurosumi et al., 2009), e resíduos têxteis a base de algodão (Yang et al., 2012).

Há uma grande quantidade de resíduos orgânicos que acabam sendo descartados de forma inadequada na natureza acentuando ainda mais a poluição. No entanto, esses resíduos são ricos em açúcares (glicose, frutose, sacarose e lactose) e nutrientes (nitrogênio e vitaminas) que podem ser úteis para a síntese de CB (Almeida, 2008; Castro et al., 2012; Kurosumi et al., 2009).

Hestrin e Schramm (Hestrin & Schramm, 1954) publicaram resultados da combinação da utilização de glicose com extrato de levedura em meio de cultivo resultando em um rendimento de 0,04 g/L na produção de CB em relação a outras fontes de carbono. Poyrazolu Çoban e Biyik (Poyrazolu Çoban & Biyik, 2011) investigaram o efeito de várias fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de celulose de *A. lovaniensis* HBB5. O maior rendimento, 0,040 g/L de CB seca, reproduz os estudos de Hestrin e Schramm, seguido das fontes de carbono frutose 0,035g/L, sacarose com 0,029 g/L e etanol 0,025g/L. A fonte de nitrogênio utilizada para esses maiores rendimento foi o extrato de levedura.

Alguns autores relatam que o índice de cristalinidade da CB é afetado pela mudança da fonte de nitrogênio e de carbono (Keshk & Sameshima, 2006; Mikkelsen et al., 2009; Ruka et al., 2012). Jung e colaboradores (Jung, Lee, et al., 2010) também afirmam, em seus estudos, que a quantidade de açúcar pode influenciar no efeito osmótico, pois elevada concentração de açúcares pode promover um menor nível de atividade de água diminuindo a taxa metabólica e, conseqüentemente, a síntese de CB. Já

as variações de fontes de nitrogênio indicam que o extrato de levedura é a mais completa fonte de nitrogênio para as espécies da *Gluconactobacter*, pois fornece quantidade conveniente de nitrogênio e fatores de crescimento para as cepas.

Assim, um dos principais objetivos das pesquisas na produção de CB tem sido a melhoria do rendimento de produção que incluem o isolamento de cepas com elevada capacidade de produção (Ha et al., 2011; Shah et al., 2013) e a utilização de fontes variadas de carbono (Shah et al., 2013).

2.2.8. Aplicações da CB

A CB, como mencionado anteriormente, é um biopolímero que se destaca de seus semelhantes vegetais por possuir propriedades específicas e vantagens industriais, e que vem sendo utilizada em diversas áreas como indústria têxtil, de papel, alimentícia, farmacêutica, tratamento de efluentes, radiodifusão, mineração e refinarias (Shah & Brown, 2005; Czaja et al., 2007) como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Aplicações da CB (Czaja et al., 2007; Evans et al., 2003)

Área	Aplicação
Cosméticos	Estabilizador de emulsões como cremes tônicos, condicionadores, polidores de unhas.
Indústria Têxtil	Roupas para esportes, tendas e equipamentos de camping.
Mineração e Refinaria	Esponjas para coleta de vazamento de óleo, materiais para absorção de toxinas.
Tratamento de lixo	Reciclagem de minerais e óleos.
Purificação de esgotos	Purificação de esgotos urbanos, ultrafiltração de água.
Comunicações	Diafragmas para microfones e fones estéreos.
Indústria de Alimentos	Celulose comestível ("nata de coco").
Indústria de Papel	Substituição artificial de madeira, papéis especiais.
Medicina	Pele artificial temporária para queimaduras e úlceras, componentes de implantes dentários.
Laboratórios	Imobilização de proteínas de células, técnicas cromatográficas, meio para cultura de tecidos.
Eletrônica	Materiais opto-eletrônicos (telas de cristal líquido).
Energia	Membranas célula combustível (paládio).

Em medicina, a CB tem atraído a atenção de pesquisadores pelo fato de apresentar alto grau de pureza, hidrofiliçidade, biocompatibilidade e hipoalergenicidade. Devido à sua estrutura tridimensional particular, as membranas de CB vêm sendo estudadas como material potencial para barreira atuando na cicatrizaçãõ de feridas principalmente por possuir a capacidade de adsorver o exsudato, evitando o trauma de um curativo comercial (por exemplo, gaze) em aderir ao local do ferimento, permitindo rápida cicatrizaçãõ por manter o local hidratado (Fu et al., 2013; Shah et al., 2013). A adesãõ de plasma na superfície da CB podendo ser utilizada em enxertos, produçãõ de vasos sanguíneos resistentes e capazes de suportar a pressãõ arterial coronariana com potencial para utilizaçãõ como substituto de veias safenas e artérias mamárias em cirurgias de *bypass*, visando à revascularizaçãõ do miocárdio, assim como substituiçãõ de outros vasos sanguíneos (Recouvreux et al., 2011), como *scaffolds* para engenharia de tecidos funcionalizando a CB com parafina para formaçãõ de nanoporos e crescimento de condrócitos primários (Lustri et al., 2013; Dugan et al., 2013), em formulações transdérmicas (El-sousi et al., 2013; Abeer et al., 2014) e como sistemas de liberaçãõ controlada de fármacos funcionalizando as membranas de CB ou modificando o sistema de produçãõ para obtençãõ de nanofibras diferenciadas facilitando o carreamento do fármaco (Wei et al., 2011; Jung, Jeong, et al., 2010; Barud et al., 2011; Trovatti et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Lustri et al., 2015; Lazarini et al., 2016).

Chawla e colaboradores (Chawla et al., 2009) relatam, em seus estudos, que para um material ser considerado propício para utilizaçãõ como substituto temporário de pele, principalmente em feridas, úlceras venosas e escaras, tanto estruturalmente como funcionalmente, é essencial que apresente as características de não toxicidade, biocompatibilidade, hipoalergenicidade, habilidade de funcionar como barreira perante infecções, habilidade de controle de perda de fluido, habilidade de reduçãõ de dor durante o tratamento, habilidade de manutençãõ de hidrataçãõ, permitir a introduçãõ ou transferênciã de fármacos e ou outras moléculas bioativas para o ferimento, adsorver secreções que ocorrem durante a cicatrizaçãõ, apresentar alta resistênciã mecânica e elasticidade. Assim a CB se encaixa muito bem como um material a ser utilizado como substituto temporário de pele.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

1. Objetivos

1.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivos a obtenção de membranas de CB cultivadas em meios com fontes de carbono diversificadas, bem como a seleção de variedades da *G. hansenii* ATCC 23769 com maior eficiência na síntese por aplicação de pressões seletivas química e físicas. Foram também objetivos deste trabalho a determinação do rendimento de produção, caracterização das membranas, e das variedades de *G. hansenii* e estudo de liberação sustentada de fármacos e/ou complexos metálicos.

1.2. Objetivos Específicos

- Produzir meios de cultivos com fontes diversificadas de nutrientes para síntese de membranas de CB por *G. hansenii* ATCC 23769 e analisar o rendimento de produção em massa seca;
- Avaliar as características microscópicas, por MEV e FT-IR, das membranas de CB produzidas comparando com meios publicados na literatura;
- Determinar a melhor densidade óptica (DO) de inóculo para produção de CB e analisar o rendimento em massa seca das membranas produzidas;
- Sintetizar o complexo metálico de Ag(I) com clortalidona (Ag-CLR);
- Avaliar a capacidade de retenção e liberação sustentada de fármacos antibacterianos e complexo metálico Ag-CLR pelas membranas de CB que apresentaram melhor rendimento em massa seca;
- Submeter as cepas de *G. hansenii* ATCC 23769 a pressões seletivas química (variações de pH) e físicas (variação de temperatura e do tempo de exposição à luz ultravioleta) visando à seleção de novas variedades com maior potencial de síntese de CB;
- Analisar o rendimento de produção de CB, em massa seca, após aplicação das pressões seletivas;
- Avaliar as características físicoquímicas das membranas de CB por MEV, DRX e FTIR;

- Avaliar as características morfológicas das UFC e das membranas de CB produzidas por *G. hanseni* ATCC 23769, após a aplicação das pressões seletivas, por MEV.

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

1. Materiais

1.1. Reagentes utilizados na composição dos meios de cultivo para síntese de membranas de celulose bacteriana (CB).

Os reagentes utilizados para a composição dos meios de cultivo, para produção de CB, foram frutose, sacarose, fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), ácido acético glacial, hidróxido de sódio (NaOH), sulfato de amônio $(NH_4)_2SO_4$, sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) e etanol absoluto obtidos da empresa SYNTH. Extrato de levedura e glicose foram obtidos da empresa MERCK. Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) foi obtido da empresa VETEC. Peptona foi obtida do laboratório BD. Ácido cítrico foi obtido do laboratório ECIBRA. Ágar foi obtido da empresa KASVI. Glucose de milho Karo®.

1.2. Reagentes utilizados na síntese do complexo metálico Ag(I) clortalidona (Ag-CLR).

O ligante clortalidona (CLR) é disponível comercialmente e foi adquirido do laboratório SIGMA-ALDRICH. O nitrato de prata ($AgNO_3$) foi adquirido do laboratório SYNTH.

2. Métodos

2.1. Preparo dos diferentes meios de cultivo utilizados na produção de CB.

Os reagentes utilizados para a formulação dos meios de cultivo, descritos na Tabela 2, foram pesados em balança analítica (Shimadzu AUY220) e preparados em frascos de rosca de 1000 mL (Boeco). O pH foi ajustado para 4,5 nos meios frutose (FRU), meio sintético 1 (MS1), meio sintético 2 (MS2), meio Zhou (Z) (Zhou et al. 2007) e meio Yamanaka (Y) (Yamanaka et al. 1989) com ácido acético glacial, considerado como pH ótimo para produção de membranas de CB por *G. hansenii* (Abeer et al. 2014). Para o meio descrito na literatura, Hestrin e Schramm (HS) o pH foi ajustado para 6 com NaOH (Hestrin & Schramm 1954). Em seguida, os meios foram autoclavados a 121°C por 30 minutos. Após autoclavagem, os meios de cultivo foram estocados em temperatura ambiente nos próprios frascos.

Tabela 2. Composição dos meios de cultivo em g/L.

Constituintes	MS1	MS2	FRU	HS	Z	Y
Glicose	20	12	-	25	20	
Sacarose	40	42,5	-	-		50
Frutose	-	12,7	60	-		
Glucose de milho					6	
Etanol	50mL	50mL	50mL	-		
Extrato de Levedura	5,6	5,6	5,6	5		5
Peptona	-	-	-	5		
Ácido cítrico	-	-	-	1,15		
Na ₂ HPO ₄	-	-	-	2,5		
K ₂ HPO ₄	1	1	-	-	1	3
(NH ₄)SO ₄					6	5
MgSO ₄ 7H ₂ O					0,40	0,05

2.2. Reativação da cepa de *G. hansenii* (ATCC 23769).

A amostra bacteriana de *G. hansenii* ATCC 23769 utilizada, adquirida da Coleção de Culturas da Fundação André Tosello, foi reativada, a partir de um estoque em glicerol 20% sob refrigeração em criotubo a -80°C, em 50mL meio FRU (Tabela 2) cultivado, sob agitação, em estufa incubadora Shaker de bancada tipo B.O.D a 28°C (Marconi), a 250 rpm, por 24 horas e, posteriormente, mantido em cultivo estático em BOD 28°C por 3 dias até a produção de uma manta de CB. A seguir, o cultivo foi vigorosamente agitado para remoção das bactérias da manta, sendo este, utilizado como pré-inóculo.

2.3. Preparo do pré-inóculo de *G. hansenii* (ATCC 23769).

A amostra reativada, como descrito no item 2.2., foi utilizada para os testes de produção de CB em temperaturas mínima de 21°C e máxima de 35°C. Em recipientes plásticos estéreis foram adicionados 200mL de meio FRU e 50mL do pré-inóculo. Os recipientes foram incubados, em B.O.D. a 21°C e 35°C por 7 dias, em cultivo estático.

Essas temperaturas correspondem a $\pm 7^{\circ}\text{C}$ a partir da temperatura ótima de 28°C descrita na literatura (Abeer et al. 2014) para a produção de CB. Após esse período as membranas foram retiradas e analisadas quanto suas características macroscópicas em relação à espessura. Foi utilizado como pré-inóculo, para o desenvolvimento das etapas seguintes da pesquisa, aquele de onde foi obtida a membrana visualmente mais espessa.

2.4. Produção das membranas de CB nos diferentes meios de cultivo.

Para a produção das membranas de CB, foram adicionados 100mL de cada meio de cultivo (Tabela 2) em erlenmeyers e inoculados com o pré-inóculo descrito no item 2.3., em quantidade suficiente para atingir a DO correspondente à escala nefelométrica 1 de McFarland. O cultivo estático foi mantido a temperatura de 28°C em B.O.D., até atingir a fase logarítmica de crescimento, para que o crescimento bacteriano fosse ambientado às condições de cultivo.

Após essa etapa, 5mL de cada um dos diferentes meios (Tabela 2) foram acrescidos do pré-inóculo de ambientação até atingir a DO correspondente à escala nefelométrica 0,5 de McFarland. Os tubos foram mantidos em cultivo estático, em B.O. D. a 28°C por 7 dias. Após esse período, as membranas de CB produzidas foram retiradas dos tubos, tratadas com NaOH à 80°C por 30 minutos para eliminação das bactérias e, a seguir, lavadas em água destilada, com troca periódica, em banho-maria a 60°C , até neutralização do pH. Em seguida, foram submetidas à completa desidratação em estufa de secagem (Nova Ética mod 400) a 80°C . Após esse procedimento, as membranas de CB secas foram pesadas em balança analítica para determinação do melhor rendimento de produção em massa seca. O experimento foi realizado em triplicata.

A determinação do rendimento de produção em massa seca (R_{MS}) foi realizada utilizando a seguinte expressão (1):

$$(1) \quad R_{MS} = \frac{M_S}{V}$$

onde M_S corresponde à massa seca da membrana de CB (g) e V , ao volume (L) do meio de cultivo.

2.5. Caracterização das membranas de CB produzidas nos diferentes meios de cultivo.

As membranas de CB produzidas nos diferentes meios de cultivo foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), e por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a realização da caracterização por FTIR e MEV, foram utilizadas membranas de CB desidratadas, como descrito no item 2.4.

2.5.1. Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise das membranas de CB desidratadas, produzidas nos diferentes meios de cultivo, foram analisadas por FTIR com a finalidade de avaliar os principais grupos funcionais, característicos de CB, utilizando o espectrômetro Cary 630 FTIR Agilent, em modo de transmitância na região de 4000 a 600cm⁻¹.

2.5.2. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

As membranas de CB desidratadas, produzidas nos diferentes meios de cultivo foram caracterizadas por MEV, para a análise das características morfológicas em relação às diferenças entre os entrelaçamentos, espessuras das fibras e na porosidade das membranas produzidas nos diferentes meios de cultivo, com aumento de 50.000x, utilizando o microscópio JEOL JSM- 6360 LV, após recobrimento com carbono.

2.6. Determinação da melhor densidade óptica e análise de rendimento em massa seca na produção de membranas de CB.

Um cultivo bacteriano saturado de *G. hansenii* (ATCC 23769), produzido a partir do aumento de massa, através da técnica de semeadura em estrias, oriundo do pré-inóculo de melhor produção descrito no item 2.3., em fase logarítmica de crescimento, foi submetido a diluições seriadas comparáveis as escalas nefelométricas 1,0, 2,0, 4,0, 5,0, 7,0 e 10,0 de McFarland, para um volume final de 10mL, em tubos de ensaio com tampa, nos meios descritos na tabela 2 (com exceção dos meios Z e Y). Após 7 dias de cultivo estático a 28°C, em estufa B.O.D., foram realizadas as análises de rendimento, em massa seca, das membranas de CB produzidas. O experimento foi realizado em triplicata.

As amostras foram retiradas dos tubos, tratadas com NaOH à 80°C por 30 minutos para eliminação das bactérias e, a seguir, lavadas em água destilada, com troca

periódica, em banho-maria a 60°C, até neutralização do pH e em seguida, foram submetidas à completa desidratação em estufa de secagem (Nova Ética mod 400) a 80°C, lavadas em banho-maria a 60°C, com troca periódica da água, até clareamento total e, em seguida, foram mantidas em estufa de secagem (Nova Ética mod 400) a 80°C até completa desidratação. Após esse procedimento, as membranas de CB secas foram pesadas em balança analítica para determinação do melhor rendimento de produção em massa seca.

A determinação do rendimento de produção em massa seca (R_{MS}) também foi realizada utilizando a expressão (1), descrita no item 2.4. deste Capítulo.

2.7. Síntese do complexo metálico prata (I) com clortalidona (Ag-CLR)

A síntese do complexo Ag-CLR foi realizada pela reação de 10mL de uma solução metanólica contendo 1,0mmol de clortalidona com com 2mL de uma solução aquosa contendo 1,0mmol de AgNO₃. A reação de síntese ocorreu em pH alcalino (pH10). A síntese foi realizada em agitação constante, a temperatura ambiente. Após uma hora de reação, o sólido branco obtido foi coletado por filtração, lavado com água destilada gelada e seco em dissecador sob pressão negativa e ao abrigo da luz, por duas horas. O complexo Ag-CLR foi armazenado em tubo de microcentrífuga estéril, envolto em papel alumínio e estocado ao abrigo da luz até o momento do uso.

2.8. Avaliação da capacidade de retenção e liberação sustentada de ceftriaxona e do complexo Ag-CLR pelas membranas de CB.

Para o teste de difusão em discos, seguindo a metodologia de Jean B. Patel, Franklin R. & Institute (2014) foi preparada uma solução aquosa de ceftriaxona (CRO) na concentração igual 2,0 mg/mL e uma suspensão em água de Ag-CLR com concentração de 20 mg/mL. Para o ensaio de difusão de CRO, discos de CB produzidas nos meios MS1, MS2 e FRU, que apresentaram maior rendimento em massa seca, com 10mm de diâmetro, foram impregnados com 50µL da solução de CRO (100 µg/disco) e com 50µL da suspensão de Ag-CLR (1000µg/disco). A seguir, esses discos foram submetidos à completa desidratação, em temperatura ambiente, no interior de fluxo laminar.

A seguir, os discos secos, contendo CRO e Ag-CLR foram aplicados na superfície de placas contendo ágar Muller-Hinton (MH) inoculado com *S. aureus* ATCC

25923. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após decorridas 24 horas de incubação, foram realizadas as mensurações dos halos de inibição de crescimento bacteriano. Em seguida, os discos contendo CRO e o complexo metálico Ag-CLR foram retirados das placas e repassados para novas placas de Petri contendo ágar MH, inoculado com *S. aureus* ATCC 25923 e as mesmas foram incubadas da mesma forma descrita acima. As placas foram incubadas por mais 24 horas, para a leitura de 48 horas de difusão. O mesmo procedimento foi repetido até que não ocorresse a formação de halos de inibição ao redor das membranas de CB.

2.9. Aplicação de pressões seletivas em cultivo de *G. hansenii* (ATCC 23769).

A partir de um volume de 250mL do cultivo de *G. hansenii*, na fase logarítmica de crescimento, um inóculo foi semeado em placas de ágar FRU (frutose - 60g/L, extrato de levedura-5,6g/L, etanol absoluto-50mL/L, ágar bacteriológico-34g/L), visando à obtenção de colônias isoladas pelo método de semeadura em estrias. A placa foi incubada a 28°C por 7 dias em estufa B.O.D. Após isolamento, 5 colônias, com as mesmas características fenotípicas macroscópicas, foram suspensas em 5,0 mL de meio FRU e, foram utilizadas para a produção do pré-inóculo. A partir desse pré-inóculo, placas de Petri contendo ágar FRU foram semeadas, em estrias, visando à obtenção de colônias isoladas. As placas foram submetidas às pressões seletivas em diferentes temperaturas e diferentes tempos de exposição UV, como descrito na Tabela 3. Para a pressão seletiva em diferentes valores de pH, um inóculo de 50mL do cultivo de *G. hansenii*, na fase logarítmica de crescimento foi adicionado em 200mL de meios FRU com diferentes valores de pH (Tabela 3). As placas submetidas as pressões seletivas em diferentes temperaturas (20, 25, 28 e 35°C), foram mantidas sob incubação em B.O.D por 7 dias. As placas submetidas às pressões seletivas em diferentes exposições no UV, foram incubadas a 28°C em B.O.D. por 7 dias. As amostras submetidas às pressões seletivas em diferentes valores de pH, após 1 dia de incubação a 28°C em B.O.D., foram semeadas, em estrias, visando a obtenção de colônias isoladas, em placas de Petri contendo ágar FRU pH 4,5 e incubadas a 28°C em B.O.D. por 7 dias. As colônias isoladas foram analisadas quanto às características fenotípicas macroscópicas (cor, textura, morfologia colonial e tamanho). As diferentes colônias obtidas foram testadas quanto à capacidade produção de membranas de CB.

Tabela 3 - Relação das pressões seletivas as quais foram submetidos os cultivos de *G. hansenii* (ATCC 23769).

Pressão seletiva	Condições			
Exposição à luz U.V. (280nm)	5min	10 min	30 min	-
Temperatura (°C)	20	25	28	35
pH	3	4,5	7	10

2.10. Produção de membranas de CB a partir das colônias obtidas após pressão seletiva e rendimento em massa seca.

As diferentes colônias isoladas e selecionadas, após aplicação das pressões seletivas, foram inoculadas em 10mL de meio FRU (pH4,5) e incubadas a 28°C em B.O.D. por 7 dias. Após este período, foi avaliada a capacidade de produção de celulose por cada uma das colônias. As colônias produtoras de CB foram semeadas em placas de Petri contendo ágar FRU (pH 4,5) e incubadas em B.O.D. a 28°C por um período suficiente para aumento de massa celular.

Após aumento de massa celular das diferentes colônias, foram produzidos inóculos, na DO correspondente à escala nefelométrica 1 de McFarland, em tubos de cultivo contendo 10mL de meio FRU. Os tubos foram incubados a 28°C em B.O.D. por 7 dias, para verificação comparativa da capacidade de produção de celulose. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Após os 7 dias de cultivo, os tubos foram vigorosamente agitados em vortex, para a remoção das bactérias aderidas. A seguir, as membranas foram retiradas dos tubos, no interior de fluxo laminar utilizando pinça de aço inox estéril, para evitar a contaminação do cultivo. Posteriormente, as membranas foram exaustivamente lavadas em recipientes com água destilada a 60°C, em banho-maria de agitação interna (Nova Ética MOD. HX 500/4D). A seguir, as membranas foram submetidas à secagem completa em estufa ventilada a 60°C (Nova Ética MOD. 400). Após secagem, as massas foram mensuradas em balança analítica para a avaliação do rendimento de produção massa seca/volume.

O rendimento de produção em massa seca (R_{MS}) foi realizado utilizando a expressão (1) descrita no item 2.4. deste Capítulo.

2.11. Caracterização das membranas de CB e das variantes fenotípicas de *G. hanseni* ATCC 23769, obtidas após pressões seletivas.

A caracterização das membranas de CB, nas diferentes pressões seletivas (Tabela 3), foi realizada por MEV utilizando o microscópio JEOL JSM- 6360 LV, por FTIR utilizando o espectrofotômetro Cary 630 FTIR Agilent e por DRX utilizando o difratômetro XRD7000 Shimadzu diffractometer para determinação do grau de cristalinidade das membranas de CB obtidas após pressões seletivas.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Resultados e Discussão

1.1. Reativação da cepa de *G. hansenii* (ATCC 23769).

A amostra de *G. hansenii* ATCC 23769 foi reativada, como descrito no item 2.2 do capítulo 3, com sucesso, sendo produzida, após 7 dias, uma membrana consistente, certificando a capacidade de síntese de CB, permitindo sua utilização nos experimentos envolvendo a produção de membranas de CB. O cultivo foi agitado vigorosamente para a remoção das bactérias aderidas na membrana e a suspensão bacteriana obtida foi utilizada como pré-inóculo para a produção de membranas de CB.

1.2. Produção de celulose por *G. hansenii* (ATCC 23769) nas temperaturas de 21°C e 35°C.

A membrana de CB produzida em cultivo a 35°C, como descrito no item 2.3. do Capítulo 3, apresentou maior espessura, maior maleabilidade e menor grau de transparência, quando comparada com a membrana produzida a 21°C (Figura 7).

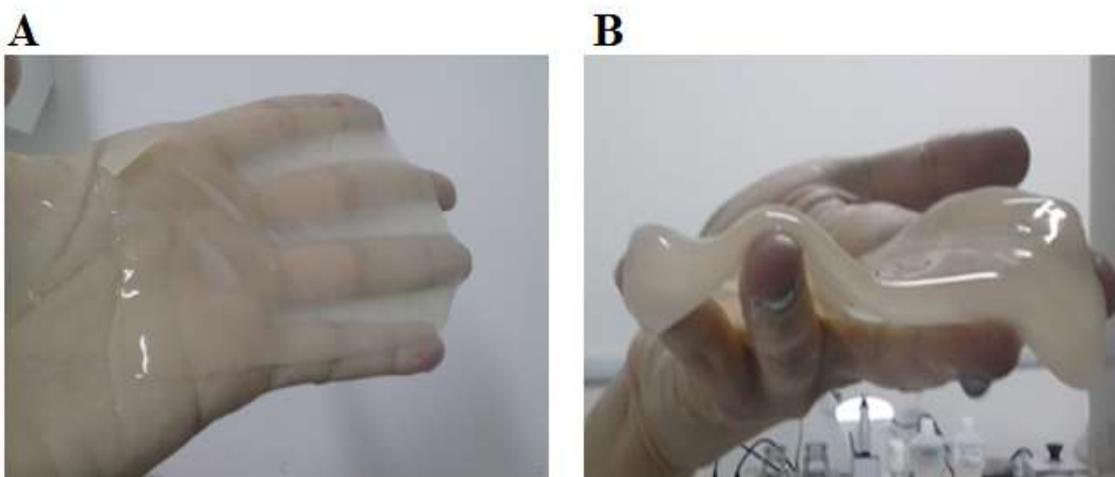


Figura 7. Membranas de CB produzidas por *G. hansenii* ATCC 23769. Painel A apresenta CB produzida em meio FRU a 21°C. Painel B apresenta CB produzida em meio FRU a 35°C. Ambas em cultivo estático por 7 dias (Fonte: próprio autor).

Esses resultados sugerem que a membrana mostrada no Painel B da Figura 7 apresenta maior quantidade de fibras, além de maior massa úmida, o que determinou a escolha do inóculo produzido a 35°C, para a utilização nos demais testes.

1.3. Produção das membranas de CB nos diferentes meios de cultivo e rendimento em massa seca.

A Figura 8 (Paineis de A a F) mostra as membranas de CB obtidas a partir do cultivo de *G. hansenii* ATCC 23769 nos diferentes meios. Como pode ser observado nos Paineis de A a D não houve diferença macroscópica significativa na espessura das membranas de CB produzidas em triplicata. Entretanto, podem ser observadas diferenças macroscópicas significativas das membranas de CB, produzidas em triplicata, nos meios MS1 e MS2 (Paineis E e F, respectivamente) quando comparadas àquelas produzidas nos outros meios (Paineis de A a D).

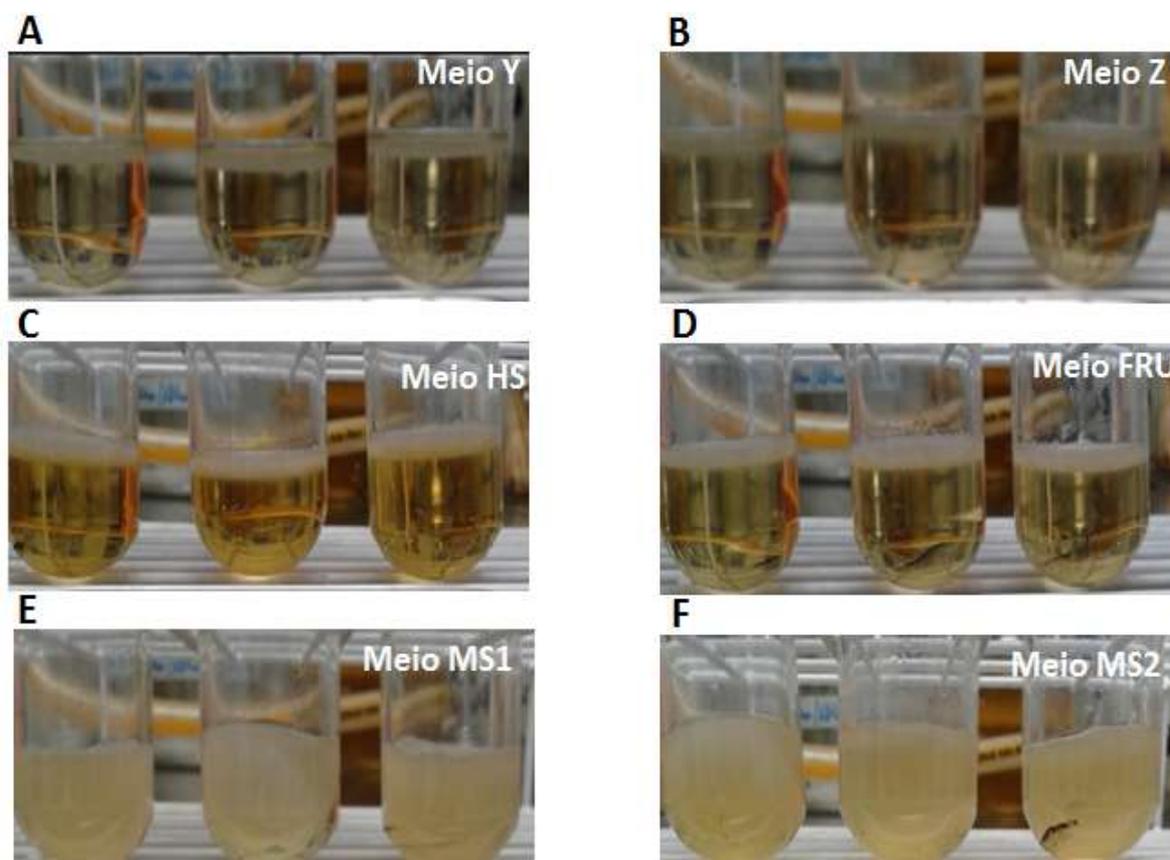


Figura 8: Membranas de CB produzidas nos diferentes meios de cultivo. Painei A - membrana de CB produzida no Meio de cultivo Y; Painei B - membrana de CB produzida no Meio de cultivo Z; Painei C - membrana de CB produzida no Meio de cultivo HS; Painei D - membrana de CB produzida no Meio de cultivo FRU; Painei E - membrana de CB produzida no Meio de cultivo MS1 e Painei F - membrana de CB produzida no meio de cultivo MS2.

Esses resultados sugerem que a bactéria *G. hansenii* ativa vias metabólicas distintas para a produção de CB na presença de monossacarídeos (glicose e frutose) e dissacarídeos (sacarose). Estudos demonstram que a ocorrência de um desvio na rota

metabólica para produção de ácidos pode diminuir o rendimento de produção de CB quando utilizado monossacarídeo como fonte de carbono (Masaoka et al. 1993; Sherif Keshk & Sameshima 2006).

Como pode ser observado na Figura 8, quando se utiliza apenas um dissacarídeo (meio Y), como fonte de carbono não são notadas diferenças nas características macroscópicas das membranas de CB, em relação aos meios que contem apenas um monossacarídeo (meios HS, Z e FRU). Entretanto, a presença de monossacarídeo e dissacarídeo na composição dos meios MS1 e MS2, aparentemente, proporcionam melhores condições para uma maior produção de CB.

No entanto, os resultados obtidos nesta etapa (Figura 9) demonstraram que, após o primeiro dia de cultivo, os pH dos diferentes meios apresentaram valores distintos em relação àqueles dos meios de cultivo antes da introdução do inoculo bacteriano (pH 4,5 para os meios MS1, Ms2, FRU, Z e Y, e 6,0 para o meio HS).

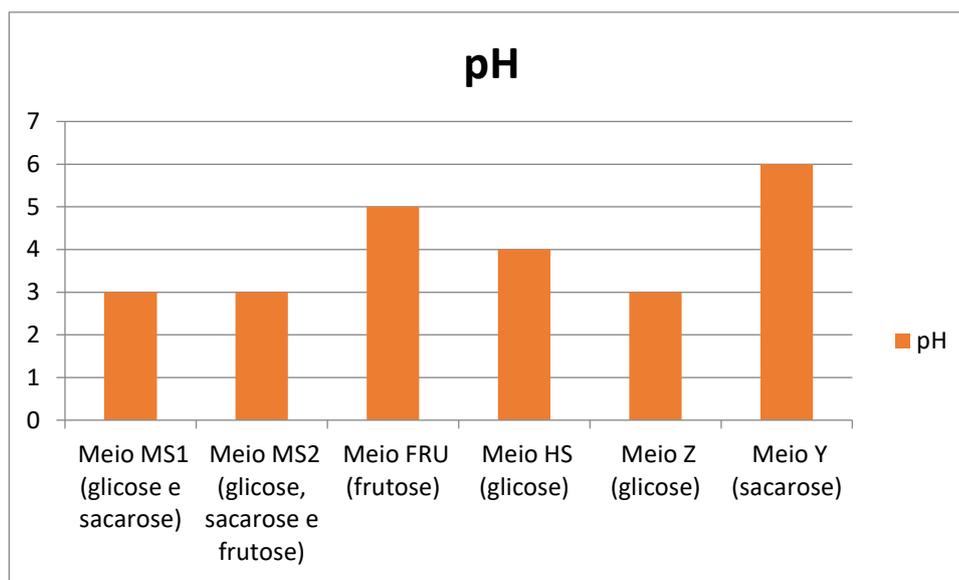


Figura 9. Comparação entre fontes de carbono e pH dos diferentes meios de cultivo após 7 dias de incubação, em B.O.D. a 28°C.

Como demonstrado na Figura 9, os menores valores de pH foram encontrados nos meios MS1, MS2, HS e Z. Esses resultados confirmam os descritos por Masaoka e Sherif (Masaoka et al. 1993; Sherif Keshk & Sameshima 2006) de produção de ácidos durante o crescimento bacteriano. Entretanto, o rendimento em massa seca de CB foi

distinto (Tabela 4), sendo maior para os meios MS1 e MS2, que apresentaram valores de pH igual a 3,0.

Tabela 4. Rendimento em massa seca das membranas de CB produzidas nos diferentes meios de cultivo.

Meio de Cultivo	g/5mL	g/L
Meio Z	0,000053	0,010
Meio Y	0,000140	0,028
HS Meio	0,000300	0,06
Meio FRU	0,000467	0,093
Meio MS1	0,001313	0,262
Meio MS1	0,001360	0,272

Os meios HS e Z, com valores de pH semelhantes aos meios MS1 e MS2 (respectivamente, 4,0 e 3,0), apresentaram menor rendimento em massa seca. Essas diferenças de rendimento podem estar relacionadas ao fato de que onde a produção de ácido nos meios HS e Z, que apresentam monossacarídeo como única fonte de carbono, utilizou este substrato para a manutenção das duas vias metabólicas, isto é, para a síntese de ácidos e de CB. Assim, o maior rendimento observado nos meios MS1 e MS2 sugere que pode ter ocorrido, inicialmente, o consumo do monossacarídeo para redução do pH e o dissacarídeo, em seguida, disponibilizando maior quantidade de fonte de carbono para a produção de CB, e uma menor quantidade apenas para manutenção dos valores baixos de pH, uma vez que, seus valores se mantiveram até o sétimo dia de cultivo.

Estudos moleculares futuros envolvendo genes relacionados às vias metabólicas basais e de produção de CB, poderão trazer melhores esclarecimentos acerca da bioquímica da produção de CB.

1.4. Caracterização físico-química das membranas de CB produzidas nos diferentes meios

As membranas de CB produzidas nos diferentes meios de cultivo foram caracterizadas por MEV e FT-IR. As imagens de MEV demonstraram diferenças entre os entrelaçamentos e espessura das fibras, além da diferença na porosidade das membranas produzidas nos diferentes meios de cultivo. A Figura 10 apresenta as imagens de MEV das membranas produzidas nos meios Y, Z, HS, FRU, MS1 e MS2, respectivamente.

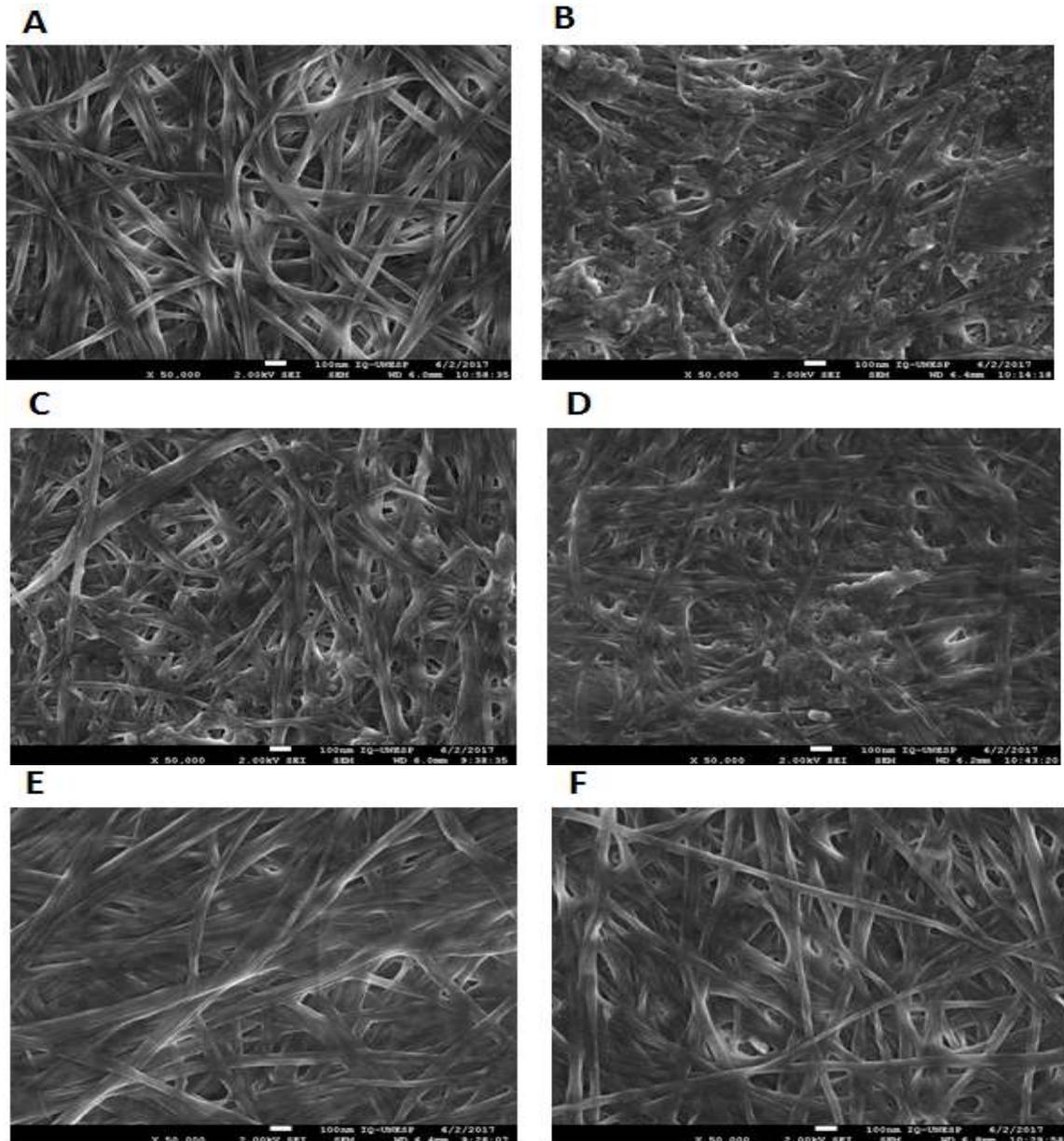


Figura 10: Imagens de MEV das membranas produzidas nos diferentes meios de cultivo. Painel A: meio de cultivo Y; Painel B: meio de cultivo Z; Painel C: meio de cultivo HS; Painel D: meio de cultivo FRU; Painel E: meio de cultivo MS1 e Painel F: meio de cultivo MS2.

Como pode ser observado na Figura 11, as CB produzidas nos meios que apresentam dissacarídeos como fonte de carbono (MS1, Ms2 e Y), demonstraram uma disposição de fibras mais organizada quando comparadas àquelas produzidas nos demais meios (FRU, HS e Z) que apresentam monossacarídeos como fonte de carbono. Esses resultados podem estar relacionados à manutenção das vias metabólicas essenciais e de produção de CB, como discutido no tópico anterior.

Os espectros de FTIR das membranas de CB obtidos, a partir de diferentes membranas produzidas nos diferentes meios de cultivo (Tabela 2), são mostrados na Figura 11. 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 (Halib et al. 2012; Lazarini et al. 2016). As análises por FTIR das membranas de CB produzidas nos diferentes meios de cultivo mostraram bandas de absorção em 3370, 2900, 1426 e 1060 cm^{-1} , confirmando, assim, a pureza das CB produzidas.

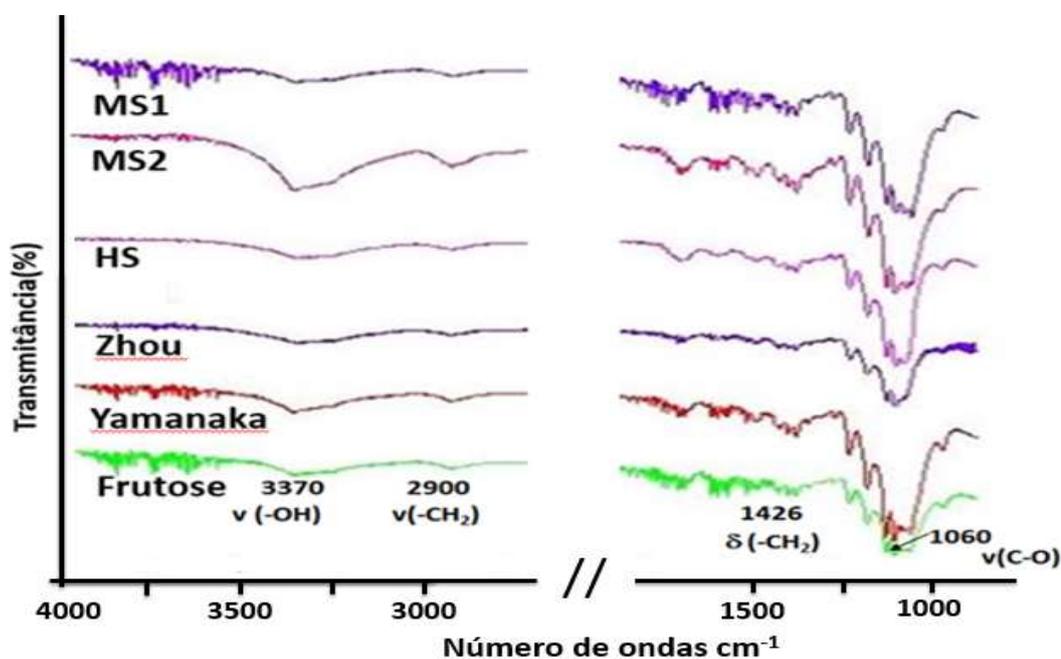


Figura 11 – Espectros de FTIR das membranas de CB produzidas nos diferentes meios de cultivo.

1.5. Determinação da melhor densidade óptica e análise de rendimento em massa seca na produção de membranas de CB.

A partir do crescimento bacteriano como descrito no item 2.6. do capítulo 3, foram realizadas diluições visando a obtenção de suspensões bacterianas nas DO correspondentes às escalas nefelométricas 1,0 (3×10^8 UFC/mL), 2,0 (6×10^8 UFC/mL), 4,0 (12×10^8 UFC/mL), 5,0 (15×10^8 UFC/mL), 7,0 (21×10^8 UFC/mL) e 10,0 (30×10^8 UFC/mL) de McFarland. A Figura 12 mostra as membranas de CB, produzidas em triplicata, nos diferentes meios de cultivo (Tabela 2) e diferentes DO utilizadas. É possível observar macroscopicamente, diferentes espessuras das membranas de CB quando comparadas entre as DO e entre os meios de cultivo.

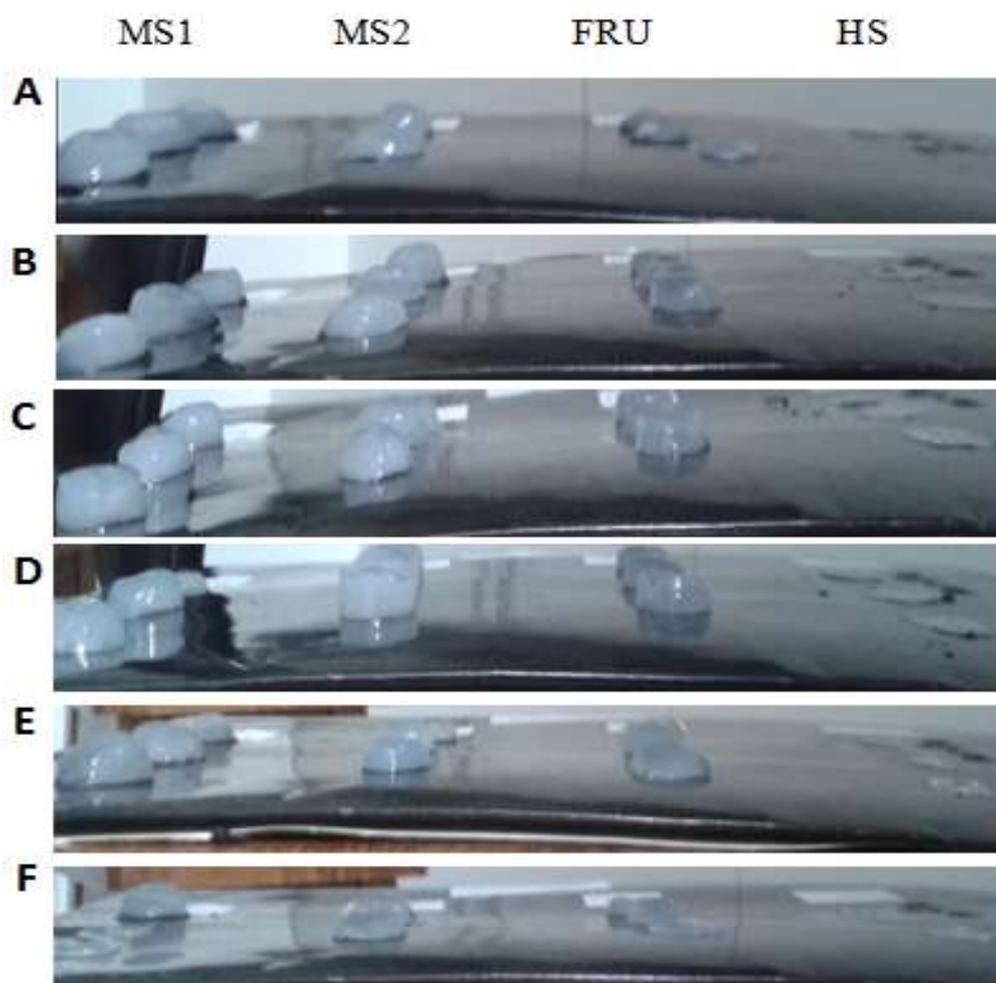


Figura 12. Membranas de CB produzidas em diferentes meios de cultivo (MS1, MS2, FRU e HS) com diferentes DO. Painel A: produção na DO 1; Painel B: produção na DO 2; Painel C: produção na DO 4; Painel D: produção na DO 5; Painel E: produção na DO 7 e Painel F: produção na DO 10.

Para a determinação concreta da melhor DO para a produção de CB, foi realizada a análise de rendimento, em massa seca, devido ao fato de que as membranas podem

apresentar diferentes graus de hidratação logo após sua síntese. Desta forma, as mensurações das massas secas trouxeram informações fidedignas sobre a quantidade de celulose presente em cada amostra.

Após o processo de desidratação completa das membranas de CB, foram determinados os rendimentos em massa seca nos diferentes meios de cultivo nas diferentes DO. Os resultados da determinação de massa seca são apresentados na Tabela 5. Os cálculos foram realizados seguindo a expressão (1) descrita no item 2.4 do Capítulo 3.

Tabela 5. Rendimento em massa seca das membranas de CB produzidas nos diferentes meios de cultivo e nas diferentes DO.

DO	Massa g/10mL				Massa g/L			
	MS1	MS2	FRU	HS	MS1	MS2	FRU	HS
1	0,01147	0,00710	0,00370	0,00120	1,147	0,710	0,370	0,120
2	0,01063	0,00937	0,00373	0,00427	1,063	0,937	0,373	0,427
4	0,01020	0,00743	0,00420	0,00603	1,020	0,743	0,420	0,603
5	0,01010	0,00980	0,00417	0,00580	1,010	0,980	0,417	0,580
7	0,01060	0,00637	0,00677	0,00697	1,060	0,637	0,677	0,697
10	0,00590	0,00583	0,00950	0,00633	0,590	0,583	0,950	0,633

Foi observado que, dependendo da composição do meio de cultivo, os melhores rendimentos em massa seca ocorreram em diferentes DO, sendo o melhor rendimento em massa seca para o meio MS1 foi na escala nefelométrica 1,0 de McFarland, para o meio MS2, na escala 5,0, para o meio FRU, escala 10,0 e para o meio HS, na 7,0 de (destaque em negrito e itálico na Tabela 5). Esses resultados reforçam o fato de que estas diferenças de rendimento estejam realmente relacionadas à ativação de diferentes vias metabólicas utilizadas pelas bactérias para maior aproveitamento das fontes de carbono presentes nos diferentes meios utilizados, para a produção de ácidos e de CB, como discutido no item 1.3 deste capítulo. Há diversos relatos de que os meios de cultivo podem ser categorizados em termos de fornecimento de diferentes fontes de carbono para a síntese CB. As fontes de carbono produzem ativação diferencial de vias biossintéticas, dependendo do

polissacárido que é fornecido. Uma fonte de carbono, tal como a frutose, também deve ser cuidadosamente considerada como um componente do meio, uma vez que nem todas as cepas utilizam a frutose como fonte para a síntese de CB (Lee et al. 2014; Abeer et al. 2014; Mikkelsen et al. 2009; Kurosumi et al. 2009).

Portanto, o fato de os menores rendimentos observados nas demais escalas, considerando que o volume dos meios para todas as DO, o período de tempo e as condições de cultivo foram os mesmos, sugere que o número de UFC e as fontes de carbono presentes em diferentes concentrações exercem direta interferência na produção de CB. De acordo com Lustri e colaboradores (Lustri et al. 2015) o metabolismo de síntese de CB e das outras vias metabólicas, essenciais para o crescimento bacteriano, apresentam a glicose como substrato básico (Figura 4 – seta branca). Baseado nessa hipótese, e nos resultados obtidos, pode-se inferir que a produção de CB esteja diretamente relacionada ao equilíbrio entre o metabolismo de síntese de CB e as vias metabólicas bacterianas essenciais.

1.6. Análise da capacidade de retenção e potencial liberação sustentada de CRO e do complexo metálico Ag-CLR pelas membranas de CB que apresentaram melhor rendimento em massa seca

As CB produzidas nos meios MS1, MS2 e FRU, que apresentaram maior rendimento em massa seca, foram cortados em discos com 10mm de diâmetro. Foram preparadas soluções aquosas de CRO de concentração de 2,0 mg/mL e de Ag-CLR de concentração de 20,0 mg/mL como descrito no item 2.7. do capítulo 3., para utilização neste ensaio. Como pode ser observada na Tabela 6, a membrana de CB produzida no meio MS1, foi a que manteve maior capacidade de retenção e liberação de CRO e do complexo metálico Ag-CLR. Discos de CB comercial (C) foram utilizados como controle no ensaio de liberação de CRO.

Tabela 6. Medida dos halos de inibição ao redor dos discos de CB produzidas em diferentes meios (MS1, MS2 e FRU) e contendo CRO e AgCLR

Tempo (horas)	Halos (mm)					
	MS1		MS2		Frutose	
	CRO	Ag-CLR	CRO	Ag-CLR	CRO	Ag-CLR
0	43 [±] 1.0	18 [±] 1.0	42 [±] 1.0	18 [±] 1.0	35	18 [±] 1.0
24	25 [±] 1.0	15 [±] 1.0	25 [±] 1.0	15 [±] 1.0	15	15 [±] 1.0
48	0	15 [±] 1.0	0	15 [±] 1.0	0	15 [±] 1.0
72	0	15 [±] 1.0	0	15 [±] 1.0	0	15 [±] 1.0
96	0	14 [±] 1.0	0	15 [±] 1.0	0	11 [±] 1.0
128	0	14 [±] 1.0	0	13 [±] 1.0	0	0
144	0	14 [±] 1.0	0	0	0	0
168	0	12 [±] 1.0	0	0	0	0

A Figura 13 apresenta resultados do teste de difusão em discos para a membrana de CB (MS1, MS2, FRU e C) na liberação de CRO.

Na literatura, existem relatos sobre o uso de CB ou de seus derivados como sistema de liberação sustentada de compostos antimicrobianos, tais como o composto CB/ cloridrato de guanidina polihexametileno (Kukharenko et al., 2014), CB incorporada com octenidina (Moritz et al., 2014), cloreto de benzalcônio (Wei et al., 2011), nanopartículas de prata (Jung et al., 2009), nanocompósitos de prata (Pinto et al., 2009) e como sistemas de liberação transdérmica de diclofenaco (Silva et al., 2014). No entanto, relatos sobre a liberação de complexos metálicos e de antibióticos, especialmente aqueles que não são disponíveis para utilização tópica, tais como CRO, são raros (Lazarini et al., 2016).

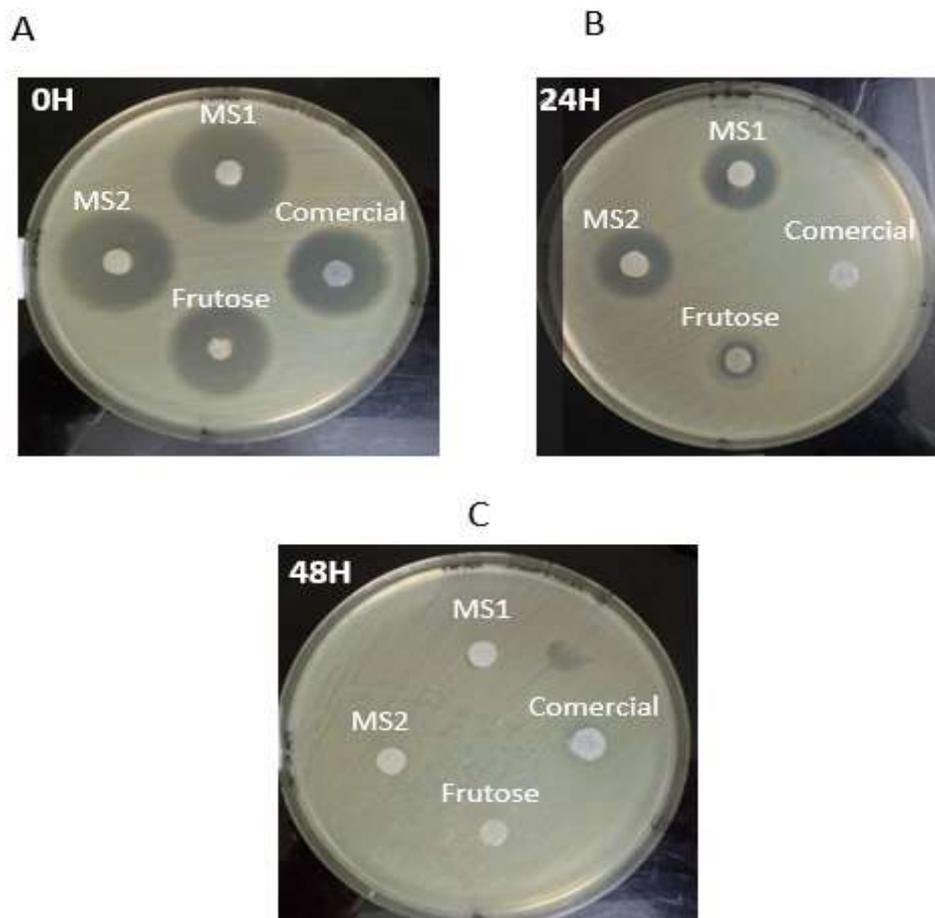


Figura 13 - Teste de difusão em discos de CB e os halos de inibição para o antibiótico CRO.

Como se pode observar nos resultados apresentados na Tabela 6 e na Figura 13, as membranas produzidas nos meios MS1 e MS2 apresentaram maior capacidade de retenção e liberação sustentada do antibiótico CRO, indicada pela manutenção do halo de inibição ao redor dos discos após 0, 24 e 48 horas de difusão.

Da mesma forma, foi analisada a capacidade de as membranas produzidas nos mesmos meios (MS1, MS2 e FRU) reterem e liberarem de forma sustentada, o complexo metálico Ag-CLR. Para a realização deste teste foi utilizada a cepa de *S. aureus* (ATCC25923). Em virtude do disco de CB comercial ter apresentado baixa capacidade de retenção de CRO, seu uso foi descartado para os ensaios de difusão com o complexo metálico Ag-CLR. Como pode ser observado na Figura 14, por análise comparativa de manutenção da capacidade de liberação sustentada de Ag-CLR, a membrana de CB produzida no meio MS1 também mostrou maior capacidade de retenção e liberação sustentada do complexo, seguida de MS2 e FRU.

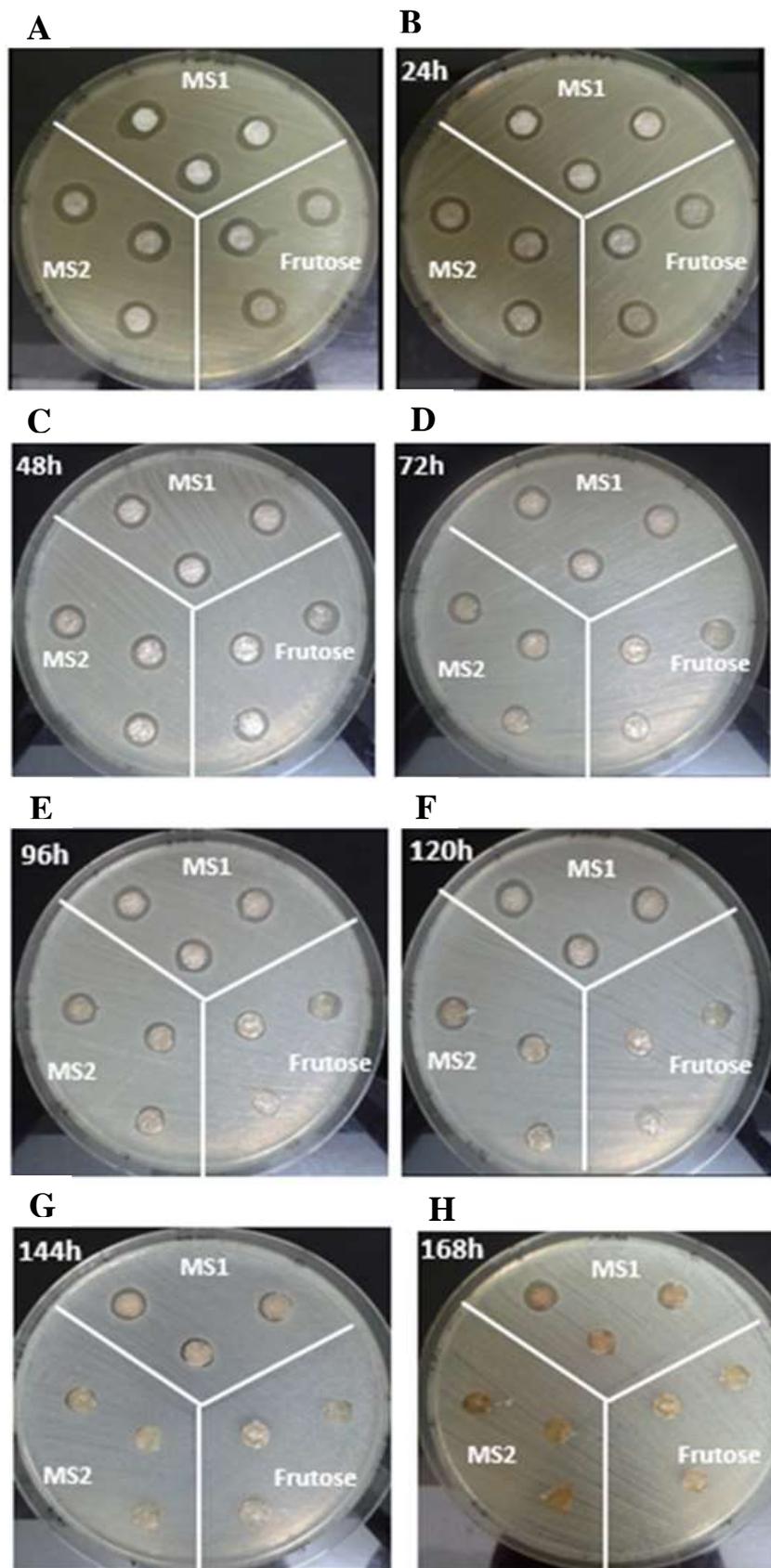


Figura 14 – Teste de difusão em discos de CB e os halos de inibição para o complexo Ag-CLR, de 0 a 168h (Paineis A- H, respectivamente).

Porém, pode também ser observada uma diferença significativa na capacidade de retenção e liberação sustentada do complexo metálico Ag-CLR em relação ao antibiótico CRO. Este fato pode estar relacionado com a hidrossolubilidade da CRO, o que faz com que a membrana de CB, em contato com o meio, se hidrate e promova a solubilização do antibiótico, acelerando sua liberação, o que não ocorre com o complexo Ag-CLR que é insolúvel em água, apresentando um potencial de difusão menor, confirmado pela diferença de medida dos halos entre os discos de CRO e Ag-CLR em horas. Os resultados apresentados sugerem que as membranas produzidas em MS1 e MS2 apresentam grande potencial para utilização como suporte de liberação sustentada de CRO e Ag-CLR visando aplicação dessas membranas de CB como curativos de longa duração.

1.7. Aplicação de pressões seletivas em cultivo de *G. hansenii* (ATCC 23769).

Diante dos resultados de rendimento em massa seca obtidos com as membranas de CB produzidas nos diferentes meios de cultivo e na liberação de CRO e do complexo Ag-CLR, foi testada a influência de pressões seletivas química (pH) e físicas (temperatura e exposição à UV), com o objetivo de selecionar variedades de *G. hansenii* a partir da espécie original ATCC 23769 que apresentasse maior rendimento de produção de CB para aplicação como suportes potenciais mais eficientes de liberação sustentada de fármacos.

A partir de um volume de 250mL de um cultivo de *G. hansenii* estático em meio FRU, a 28°C em B.O.D., na fase logarítmica de crescimento (Figura 15 Painel A), um inóculo foi semeado em placas de ágar FRU, visando a obtenção de colônias isoladas, seguindo metodologia descrita no item 2.9. do capítulo 3. A placa foi incubada a 28°C por 7 dias em estufa B.O.D. O Painel B (Figura 15) mostra as colônias, com as mesmas características fenotípicas macroscópicas, isoladas em ágar FRU, demonstrando a pureza do cultivo. Cinco colônias com as mesmas características fenotípicas macroscópicas suspensas em 5,0mL de meio FRU foram utilizadas para a produção do pré-inóculo para aplicação das pressões seletivas.

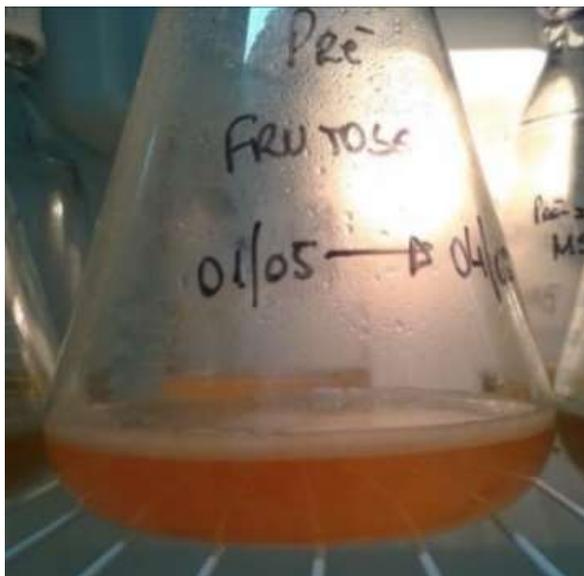
A**B**

Figura 15- Cultivo de *G. hansanii* - Painei A: Cultivo estático, a 28°C em B.O.D. por 3 dias em meio FRU, na fase logarítmica de crescimento. Painei B: Colônias isoladas com as mesmas características fenotípicas macroscópicas, demonstrando a pureza do cultivo, utilizadas para a produção do pré-inóculo.

Após aplicação das pressões seletivas (Tabela 3) e processamento das membranas de CB, como descrito no item 2.9. do Capítulo 3, foram selecionadas de 3 a 6 colônias com características fenotípicas macroscópicas diferentes. As Figuras 16, 17 e 18 apresentam, respectivamente, as diferentes características fenotípicas macroscópicas de colônias selecionadas, após aplicação da pressão em UV, temperatura e pH.

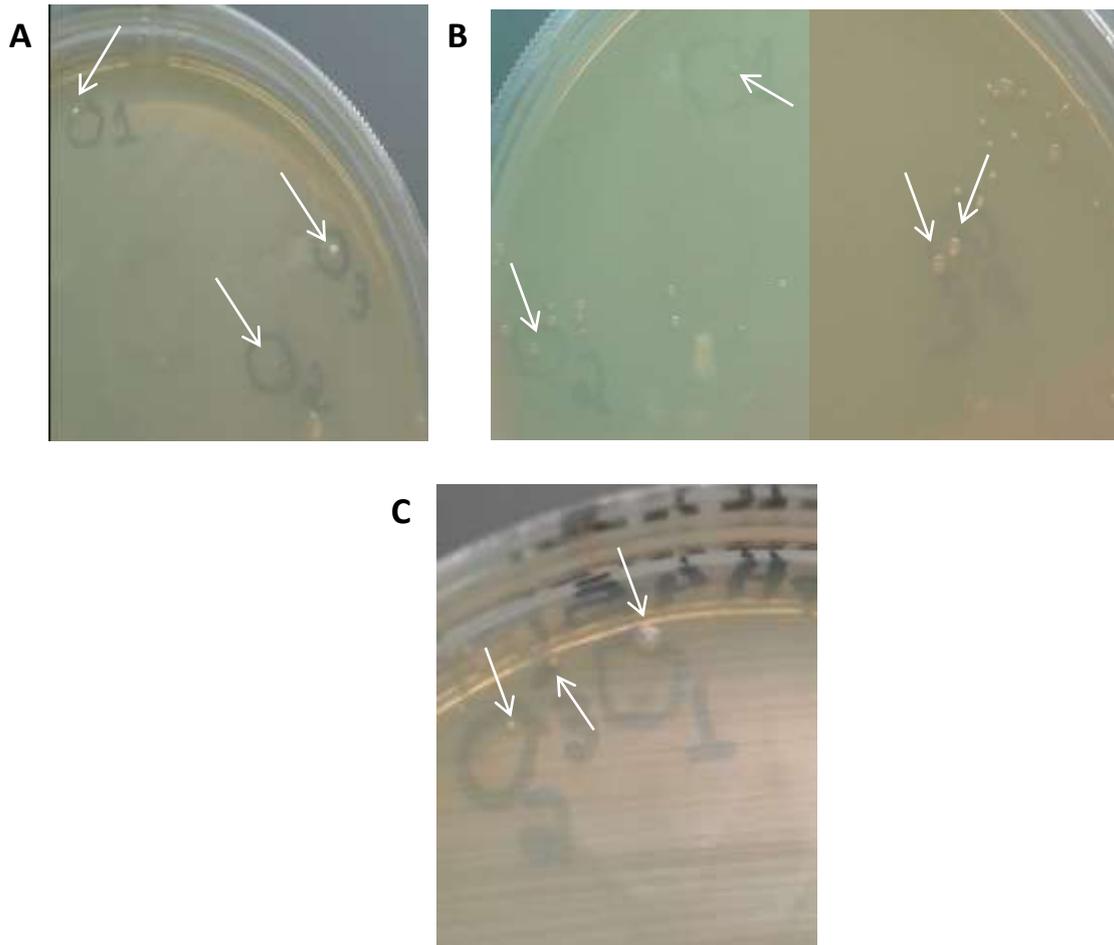


Figura 16. Características fenotípicas macroscópicas de colônias selecionadas após aplicação das pressões seletivas. As setas apontam os diferentes tipos de colônias isoladas em exposição à radiação UV por 5 minutos (Painel A), UV 10 minutos (Painel B), UV 30 minutos (Painel C).

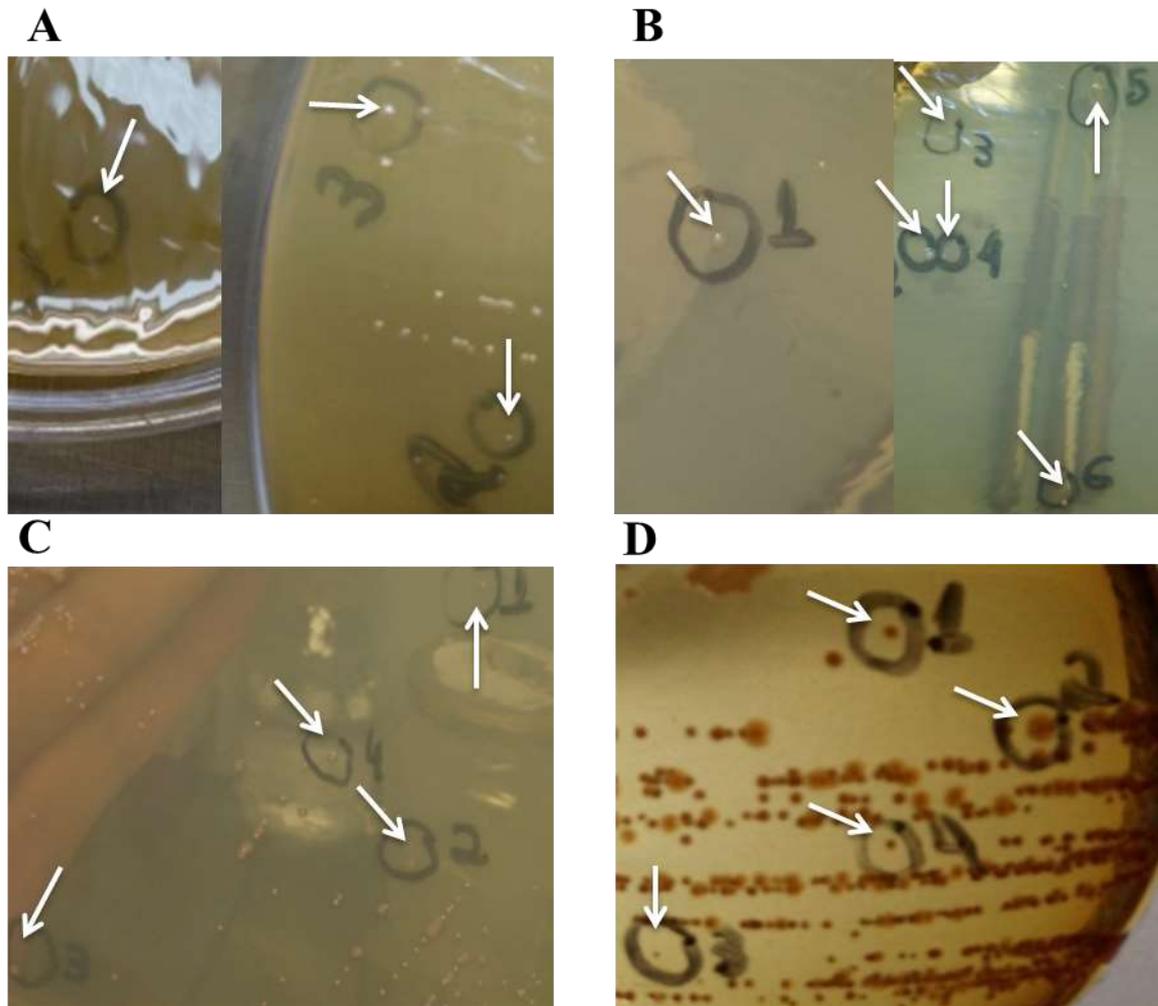


Figura 17- Características fenotípicas macroscópicas de colônias selecionadas após aplicação das pressões seletivas. As setas apontam os diferentes tipos de colônias isoladas em temperatura 20°C (Painel A), 25°C (Painel B), 28°C (Painel C) e 35°C (Painel D).

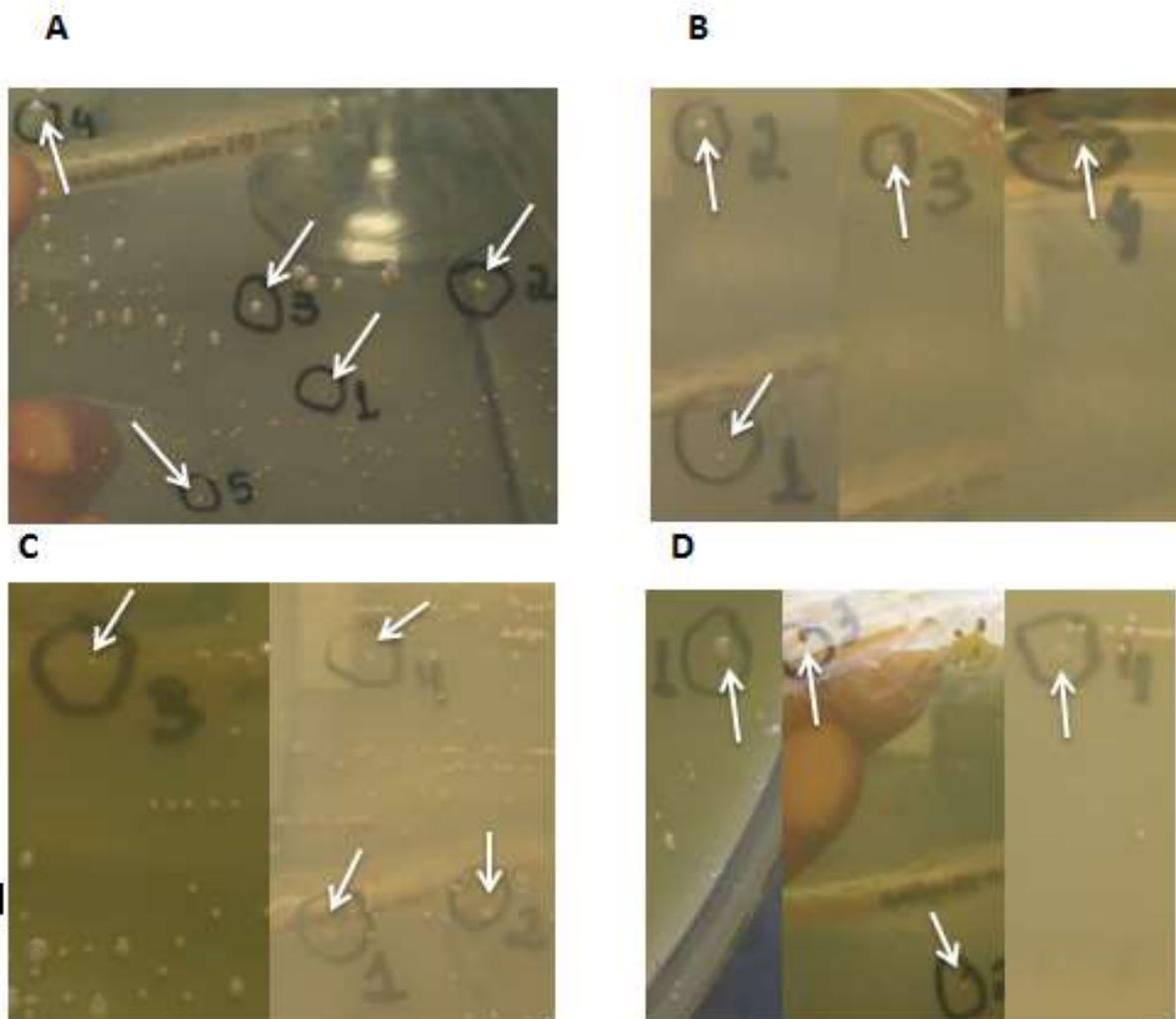


Figura 18. Características fenotípicas macroscópicas de colônias selecionadas após aplicação das pressões seletivas. As setas apontam os diferentes tipos de colônias isoladas após cultivo em pH 3,0 (Painel A), 4,5 (Painel B), 7,0 (Painel C) e 10,0 (Painel D).

Os resultados obtidos nesta etapa sugerem o desenvolvimento de variantes fenotípicas a partir da espécie *G. hansenii* (ATCC 28769) original (diferentes características macroscópicas como tamanho, cor e morfologia), tendo em vista que o pré-inóculo utilizado para os testes de aplicação das pressões seletivas foi o mesmo.

Existem relatos na literatura da ocorrência de seleção de mutantes espontâneos em cultivo agitado, que apresentam capacidade significativamente reduzida de produção de celulose (Czaja et al. 2006; Tuan et al. 2010). Segundo Nguyen e colaboradores (Nguyen et al. 2010) esses mutantes selecionados em cultivo agitado também apresentam capacidade reduzida de produção de celulose quando voltam a ser cultivados em condições estáticas. Entretanto, são raros os relatos na literatura (De Wulf et al. 1996), da obtenção de variedades de *G. hansenii* por aplicações pressões seletivas semelhantes às

utilizadas neste trabalho que apresentasse as características fenotípicas e de rendimento de produção encontrados.

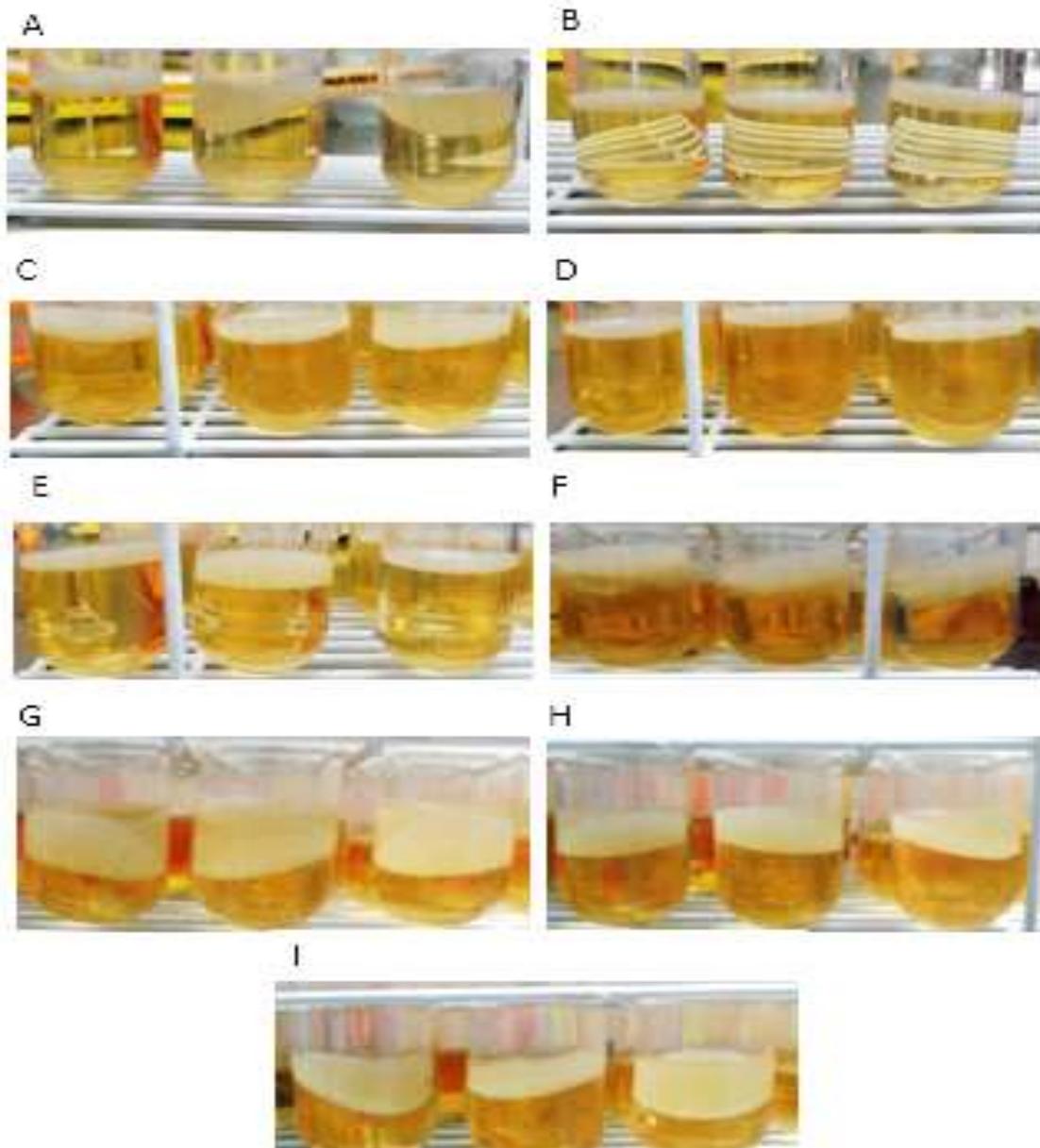
A partir do isolamento e seleção de colônias com características fenotípicas macroscópicas diferentes, as mesmas foram testadas quanto à capacidade e rendimento de produção de CB nas mesmas condições de cultivo.

1.8. Produção de membranas de CB a partir das colônias obtidas após pressão seletiva.

Um total de 46 colônias de *G. hansenii* (ATCC 23769), com características fenotípicas macroscópicas distintas, obtidas após as diferentes pressões seletivas, foram semeadas em diferentes tubos contendo 10mL de meio FRU, para a análise da capacidade de produção de CB. Os resultados obtidos demonstraram que, dos 46 cultivos, referentes a cada uma das colônias isoladas, apenas 17 foram capazes de produzir CB, sendo as restantes descartadas. Inóculos, provenientes dos cultivos onde se observou a produção de CB, foram semeados em ágar FRU, visando o aumento de massa celular bacteriana. Essas placas foram incubadas por 7 dias a 28°C em estufa B.O.D. e, a partir do crescimento bacteriano, foram produzidos 17 cultivos (em triplicata), em 10mL de meio FRU. Os tubos foram incubados por 7 dias a 28°C em estufa B.O.D. Após esse período, as membranas de CB foram comparadas, quanto ao rendimento de produção, em massa seca. A Figura 19 mostra o resultado do cultivo, em triplicata, das diferentes membranas de CB produzidas a partir de colônias obtidas nas pressões seletivas em diferentes temperaturas (20°C, 25°C, 28°C e 35°C). Como se pode observar, foram obtidas membranas com diferentes espessuras, sugerindo que os diferentes tipos de colônias, obtidas após a pressão seletiva, apresentam atividades metabólicas diferentes, relacionadas à via de produção de CB. Cabe ressaltar, também que a maior parte das colônias isoladas, após pressões seletivas, não foi capaz de produzir celulose, mesmo quando submetida à temperatura de 28°C, utilizada normalmente para a produção de CB, constituindo mutantes incapazes de produzir celulose. Esses resultados indicam que as pressões seletivas aplicadas podem ter provocado alterações genéticas que interferem nas vias metabólicas que inviabilizam a produção de celulose, sem inviabilizar o crescimento bacteriano. Os resultados também demonstraram que as colônias de menor tamanho foram as mais eficientes na produção de membranas de CB, enquanto que as colônias

incapazes de produzir CB eram as de maior tamanho. Assim, baseando nessas observações, pode-se sugerir que, quanto menor o tempo de geração, isto é, maior capacidade reprodutiva e, portanto, de formação de colônias maiores, apresentam menor a capacidade de produção de celulose.

Figura 19 - Resultado do cultivo, em triplicata, das diferentes membranas de CB produzidas a



partir de colônias produzidas após pressão seletiva em diferentes temperaturas. Painel A: produção de CB por uma colônia isolada após cultivo a 20°C; Painéis B, C e D: produção de CB por três colônias isoladas após cultivo a 25°C; Painéis E e F: produção de CB por duas colônias isoladas após cultivo a 28°C; Painéis G, H e I: produção de CB por três colônias isoladas após cultivo a 35°C.

Os resultados apresentados na Figura 19 demonstram que as colônias isoladas após pressão seletiva a 35°C apresentaram maior capacidade de produção de CB, sendo que a colônia de menor tamanho (Painel G) foi a de maior capacidade de rendimento de produção.

A Figura 20 apresenta o resultado do cultivo, em triplicata, das diferentes membranas de CB produzidas a partir de colônias obtidas nas pressões seletivas de diferentes tempos de exposição a UV (280nm) por 5, 10 e 30 minutos. Como pode ser observado na referida Figura, também foram obtidas membranas de CB com diferentes espessuras, sugerindo que os diferentes tipos de colônias, obtidas após a pressão seletiva por exposição no UV, também apresentaram características metabólicas diferentes, relacionadas à via de produção de CB.

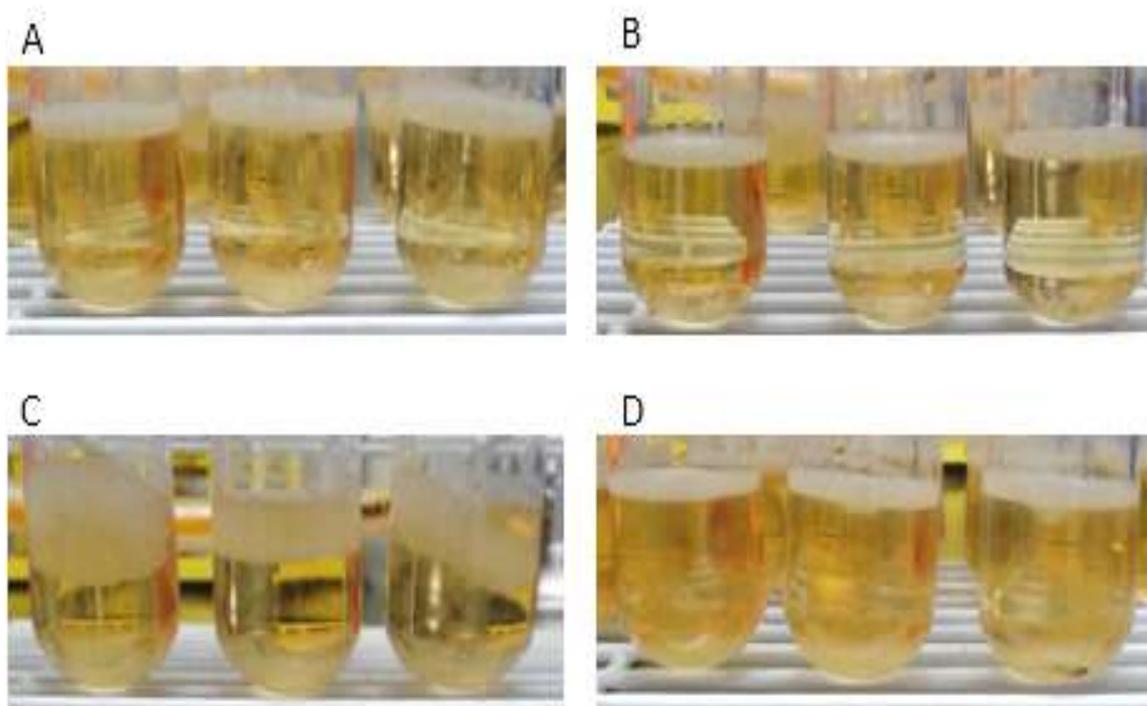


Figura 20 - Resultado do cultivo, em triplicata, das diferentes membranas de CB produzidas a partir de colônias após pressão seletiva em diferentes tempos de exposição à UV. Painel A: produção de CB por uma colônia isolada após 5 min exposição; Painéis B e C: produção de CB por duas colônias diferentes isoladas após 10 min exposição; Painel D: produção de CB por uma colônia isolada após 30 min exposição.

Os resultados também demonstraram que a colônia de menor tamanho (Figura 20 - Painel C) foi a mais eficiente na produção de membranas de CB, enquanto que as colônias com menor rendimento de produção de CB foram às de maior tamanho.

Também foram obtidas 4 colônias produtoras de CB, após pressão seletiva em diferentes valores de pH, sendo uma, em pH 3,0, uma, em pH 4,5, uma, em pH 7,0 e uma em pH 10,0. A Figura 21 apresenta o resultado do cultivo, em triplicata, das diferentes membranas de CB produzidas a partir de colônias obtidas nas pressões seletivas em diferentes valores de pH.

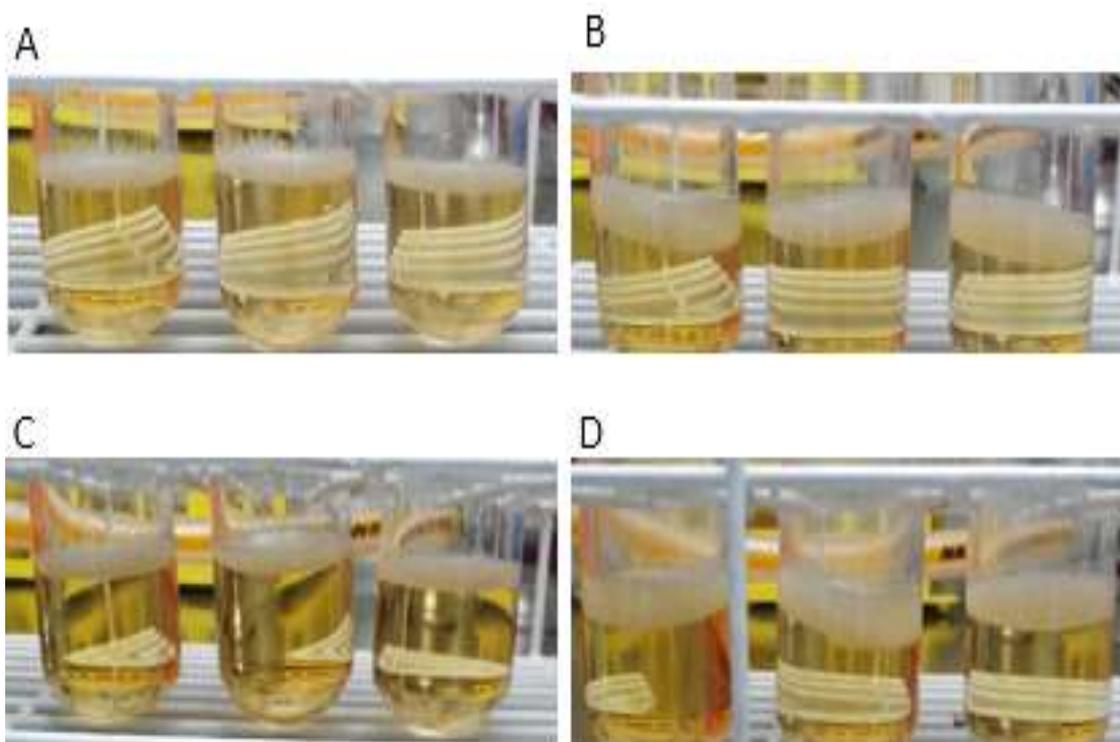


Figura 21 - Resultado do cultivo, em triplicata, das diferentes membranas de CB produzidas a partir de colônias produzidas após pressão seletiva em diferentes valores de pH . Painel A: produção de CB por uma colônia isolada após cultivo em meio de pH 3,0; Painel B: produção de CB por uma colônia isolada após cultivo em meio de pH4,5; Painel C: produção de CB por uma colônia isolada após cultivo em meio de pH7,0; Painel D: produção de CB por uma colônia isolada após cultivo em meio de pH10,0.

Como pode ser observado, neste caso também foram obtidas membranas de CB com diferentes espessuras, reforçando o fato de que os diferentes tipos de colônias, obtidas após a pressão seletiva em diferentes valores de pH, também apresentaram características metabólicas diferentes, relacionadas à via de produções de CB.

Neste caso, também, pode ser observado que foram obtidas membranas de CB com diferentes espessuras, reforçando o fato da existência de uma relação entre as diferentes morfologias de colônias e as características metabólicas, relacionadas à via de produção de CB. Aqui também se verificou que as colônias isoladas após pressão seletiva

em pH 4,5 e pH 10,0 (Painéis B e D, respectivamente) também apresentavam os menores tamanhos.

1.9. Análise comparativa do rendimento em massa seca das membranas produzidas pelas colônias selecionadas após aplicação das pressões seletivas.

As diferentes membranas de CB, produzidas pelas colônias obtidas após aplicação das pressões seletivas e desidratação, tiveram suas massas secas mensuradas para a avaliação do rendimento de produção massa seca/volume. Levou-se em consideração o volume de 10mL para a realização de todos os cálculos. As massas utilizadas nos cálculos constituem a média aritmética da triplicata.

A determinação do R_{MS} foi realizada aplicando-se a expressão (1) descrita no item 2.4. do Capítulo 3. A Tabela 7 mostra os resultados comparativos do R_{MS} das membranas de CB produzidas pelas colônias obtidas após a aplicação das pressões seletivas em diferentes temperaturas.

Tabela 7 - R_{MS} das membranas de CB produzidas pelas colônias obtidas após a aplicação das pressões seletivas em diferentes temperaturas

Temperatura	Massa g/L
20°C (Colônia 1)	1,130
25°C (Colônia3)	2,150
25°C (4 Colônia)	0,650
25°C (Colônia 6)	0,650
28°C (Colônia 1)	2,400
28°C (Colônia 5)	1,490
35°C (Colônia 2)	4,683
35°C (Colônia 3)	2,613
35°C (Colônia 4)	4,723

Como pode ser observado nos resultados apresentados na Tabela 7 o maior rendimento em massa seca foi obtido a partir das colônias isoladas após pressão seletiva a 35°C.

A Tabela 8 mostra os resultados comparativos do R_{MS} das membranas de CB produzidas pelas colônias obtidas após a aplicação das pressões seletivas em diferentes tempos de exposição à luz UV.

Tabela 8- R_{MS} das membranas de CB produzidas pelas colônias obtidas após a aplicação das pressões seletivas em diferentes tempos de exposição a luz UV.

UV	Massa em g/L
5 min (Colônia 1)	0,403
10 min (Colônia 1)	0,800
10 min (Colônia 4)	1,377
30 min (Colônia 2)	0,683

Os resultados apresentados na Tabela 8 demonstram que o maior rendimento em massa seca foi obtido a partir de uma colônia isolada após pressão seletiva em exposição à luz UV por 10 minutos.

A Tabela 9 mostra os resultados comparativos do R_{MS} das membranas de CB produzidas pelas colônias obtidas após a aplicação das pressões seletivas em diferentes pH.

Tabela 9. R_{MS} das membranas de CB produzidas pelas colônias obtidas após a aplicação das pressões seletivas em diferentes pH.

pH	Massa g/L
3 (Colônia 1)	0,740
4,5 (Colônia 1)	1,530
7 (Colônia 3)	1,020
10 (Colônia 2)	2,007

Como pode ser observado nos resultados apresentados na Tabela 9, o maior rendimento em massa seca foi obtido a partir das colônias isoladas após pressão seletiva em pH 10.

Embora tenha sido observado, para cada pressão seletiva química e física, colônias com maior capacidade de produção de CB, um destaque especial pode ser dado

à pressão seletiva relativa à temperatura, onde foram obtidas variantes bacterianas com os maiores rendimentos em massa seca, comparado com as pressões seletivas de UV e pH

Com base nesses resultados, pode-se inferir que as pressões seletivas envolvendo pH e exposição à luz UV podem ter provocado alterações genéticas que, embora não tenham determinado a inviabilidade de crescimento, promoveram diminuição na atividade relacionada à via metabólica de produção de CB. Entretanto, houve consenso no que se refere ao fato de as menores colônias serem constituídas por UFC com maior potencial de produção de CB. Essa reforça o fato de que, durante o crescimento bacteriano pode haver um desvio da rota metabólica para a produção de ATP para o metabolismo essencial, determinando maior crescimento bacteriano, portanto, formação de colônias maiores, com menor capacidade 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, com pureza determinada, a avaliação das características genéticas das colônias de maior rendimento de produção de CB, proposta para a próxima etapa de desenvolvimento do projeto, poderão trazer detalhes sobre a possível alteração genética, e sua possível relação com as diferenças metabólicas das bactérias com maior rendimento de produção.

1.10. Caracterização das membranas de CB e variantes fenotípicas de *G. hansenii*, por MEV após pressões seletivas.

As membranas de CB e as respectivas variantes de *G. hansenii*, obtidas após as aplicações das pressões seletivas, foram caracterizadas por MEV. A análise permitiu a observação da variação nas características morfológicas das bactérias produtoras de celulose, nas diferentes pressões seletivas.

Como podem ser observados na Figura 22 (Painéis A,B, C e D), os bacilos Gram-negativos, apresentaram tamanhos e formatos diferentes. Nos Painéis A e B, referentes aos cultivos a 20°C e 25°C, respectivamente, são observadas características morfológicas semelhantes de várias bactérias presas à membrana de CB (menor aumento - setas) e a característica morfológica de uma UFC (maior aumento – círculos maiores). Como demonstrado na Figura, não existem diferenças significativas no tamanho e forma das UFC das bactérias crescidas nessas temperaturas. Entretanto, quando são observadas as

características morfológicas das UFC na temperatura de 28°C (Painel C), é notada uma diferença acentuada de formato e tamanho dos bacilos presos à membrana de CB. Ao contrário do que foi apresentado nos Painéis A e B, a morfologia das UFC presas à membrana variam significativamente em formato e tamanho (menor aumento - setas). A característica morfológica de uma UFC (maior aumento – círculos maiores) mostra um bacilo com um tamanho de, aproximadamente, duas vezes maior em relação aos tamanhos das UFC observadas nos Painéis A e B. (menor aumento - setas). O Painel D apresenta a morfologia das UFC presas à membrana (menor aumento - setas) e aumento maior (círculo maior), onde se observa um tamanho relativo à metade daquele observado nos Painéis A e B e, significativamente menor do que o observado no Painel C.

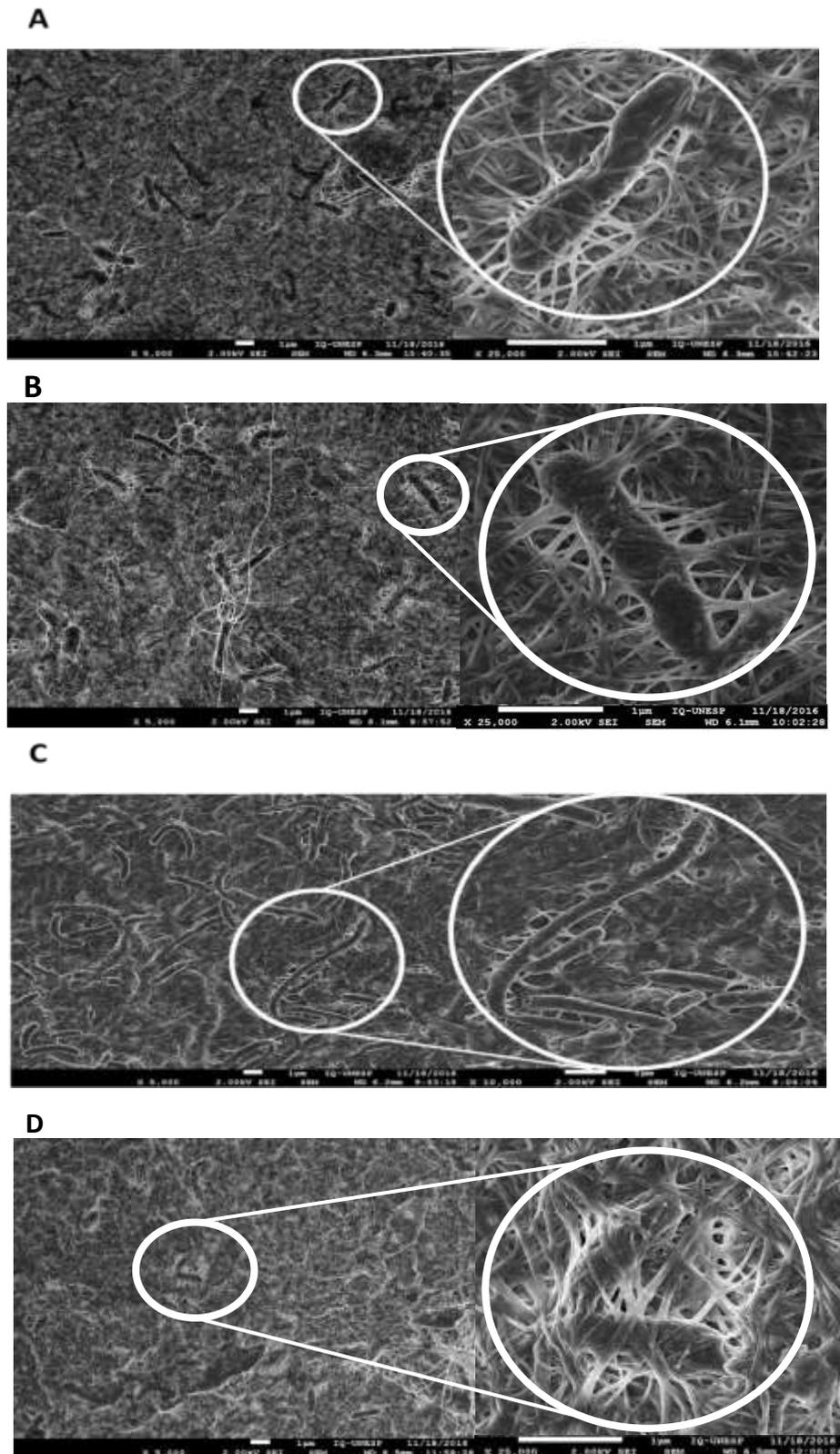


Figura 22. MEV das membranas de CB analisando a morfologia bacteriana após aplicação da pressão seletiva de temperatura. Painel A (20°C), Painel B (25°C), Painel C (28°C) e Painel D (35°C).

A Figura 23 (Painéis A, B, C e D) apresenta as MEV das membranas de CB obtidas nos cultivos em diferentes temperaturas.

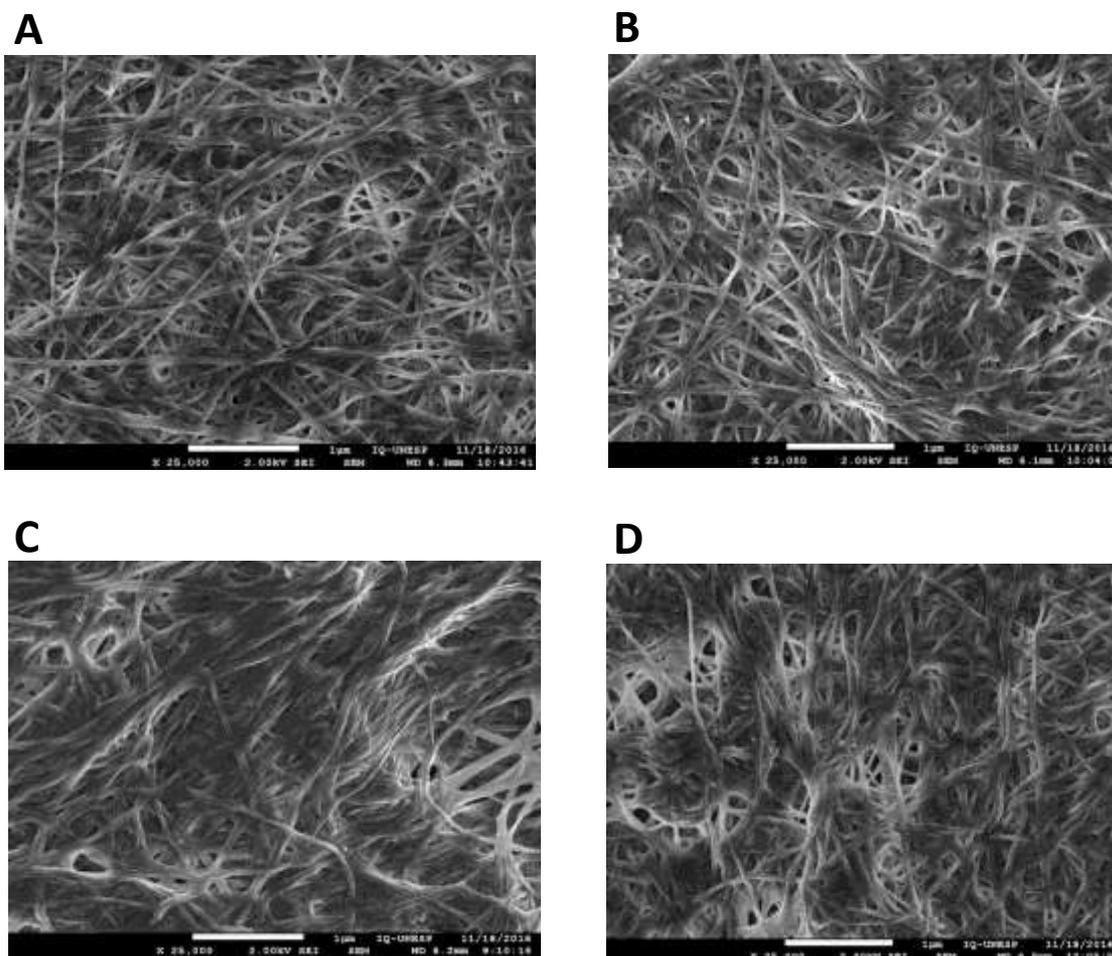


Figura 23. MEV das membranas de CB analisando as diferenças de tramas após aplicação da pressão seletiva de temperatura. Painel A (20°C), Painel B (25°C), Painel C (28°C) e Painel D (35°C).

A análise das micrografias permite visualizar diferenças entre o entrelaçamento e espessura e disposição das fibras das membranas de CB produzidas nas diferentes temperaturas. Pode-se também observar que existe uma semelhança entre o entrelaçamento e espessura e disposição das fibras das membranas de CB produzidas nas temperaturas de 20°C e 25°C, diferente do observado a 28°C e 35°C, onde o entrelaçamento e espessura e disposição das fibras das membranas de CB produzidas nessas temperaturas são significativamente diferentes entre si e entre aquelas produzidas a 20°C e 25°C, sendo um forte indício de que a morfologia das UFC (Figura 22) está diretamente relacionada à sua atividade metabólica e à produção de CB.

As Figuras 24 e 25 apresentam, respectivamente os resultados das análises por MEV das UFC e das membranas de CB produzidas após pressões seletivas em diferentes valores de pH.

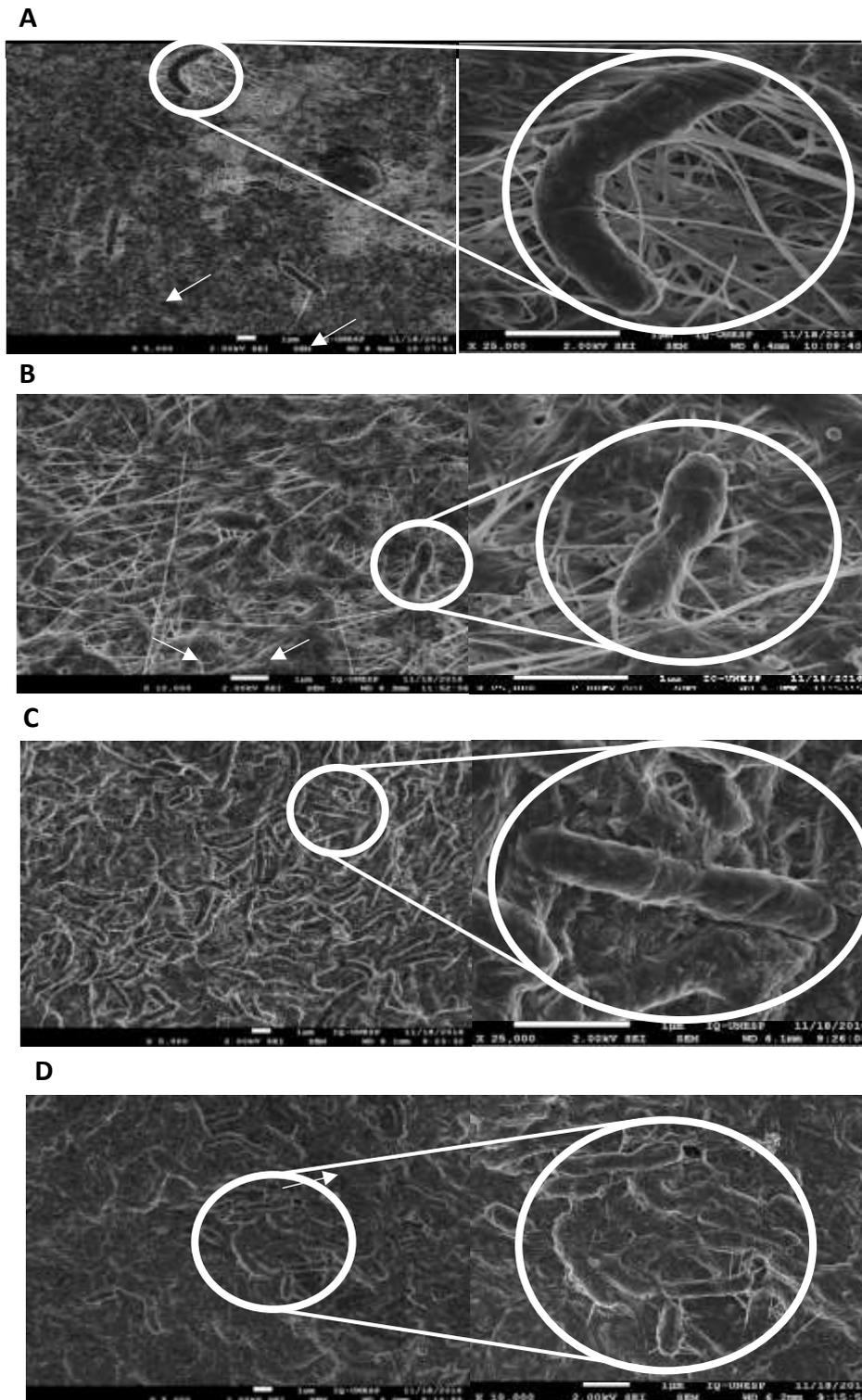


Figura 24. MEV das membranas de CB analisando a morfologia bacteriana após aplicação da pressão seletiva em pH. Paineil A (pH 3,0), Paineil B (pH 4,5), Paineil C (pH 7,0) e Paineil D (pH 10,0).

Como observado nos resultados apresentados, relacionados às pressões seletivas de temperatura (Figura 22), a morfologia das UFC e o entrelaçamento, espessura e disposição das fibras das membranas de CB também variam significativamente em relação ao pH de cultivo, demonstrando que as condições químicas afetam de forma mais significativa a atividade metabólica, a morfologia e a produção de CB (Figura 24), quando comparada aos resultados obtidos na pressão seletiva de variações de temperatura (Figura 23).

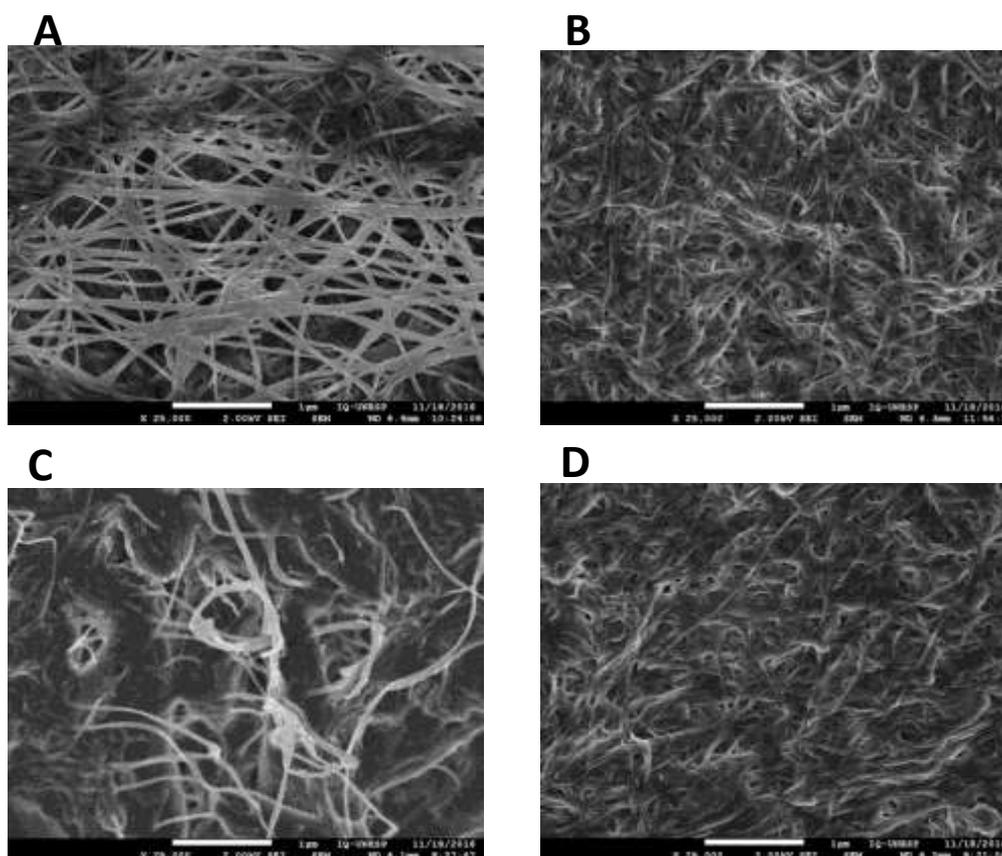


Figura 25. MEV das membranas de CB analisando as diferenças de tramas após aplicação da pressão seletiva de pH. Paineis A (pH 3,0), Paineis B (pH 4,5), Paineis C (pH 7,0) e Paineis D (pH 10,0).

Nas Figuras 26 e 27 são apresentados, respectivamente os resultados das análises por MEV das UFC e das membranas de CB produzidas após pressões seletivas em diferentes tempos de exposição à luz UV. Os resultados apresentados nas respectivas Figuras demonstram também a influência do tempo de exposição à luz UV na modificação da morfologia das UFC e o entrelaçamento, espessura e disposição das fibras das membranas de CB reforçando o fato de que as condições físicas também afetam, de forma significativa, a atividade metabólica, influenciando na modificação da morfologia e a produção de CB.

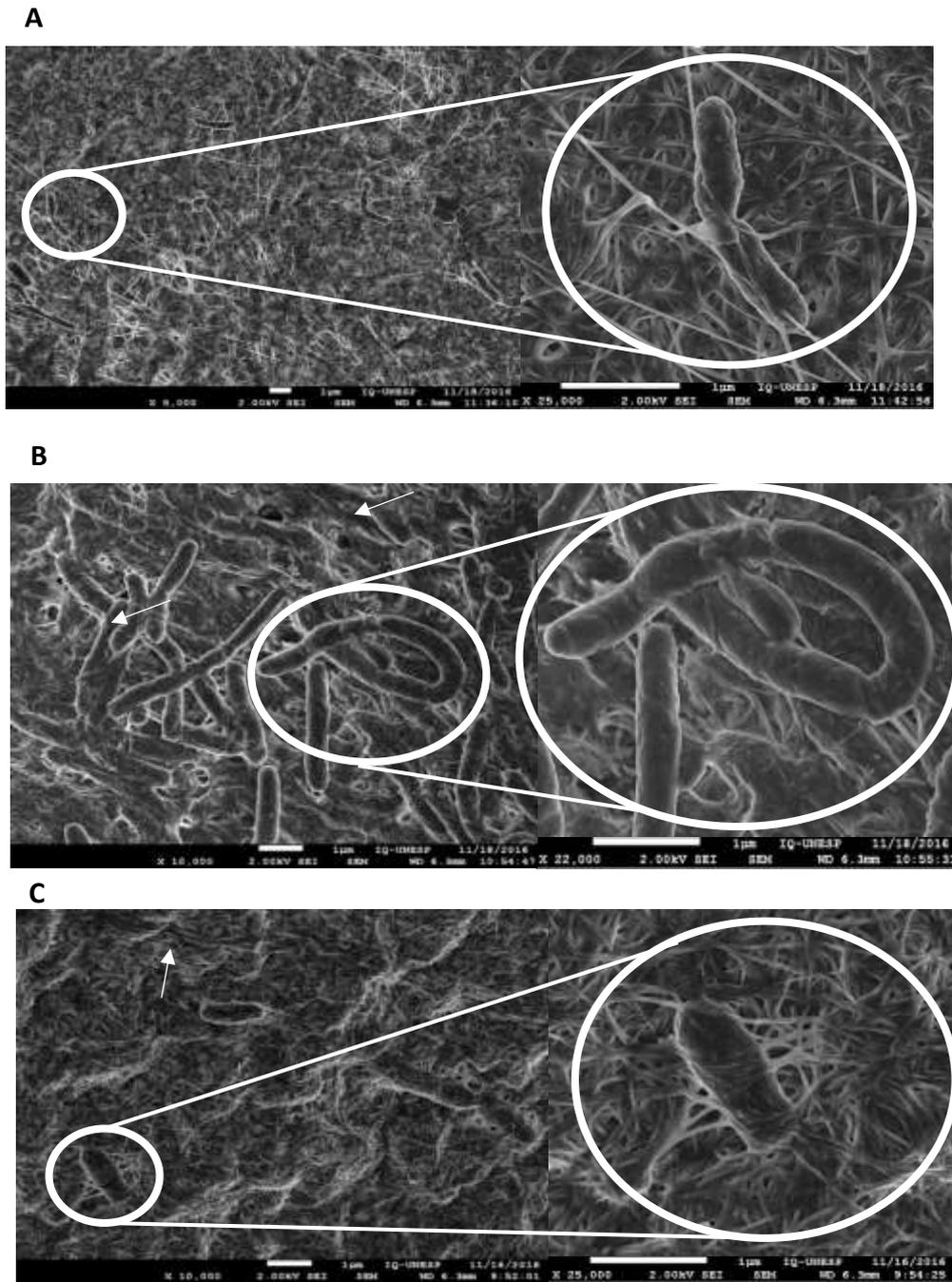


Figura 26- MEV das membranas de CB analisando a morfologia bacteriana após aplicação da pressão seletiva em exposição à luz UV. Painei A (5 min.), Painei B (10 min.) e Painei C (30 min.).

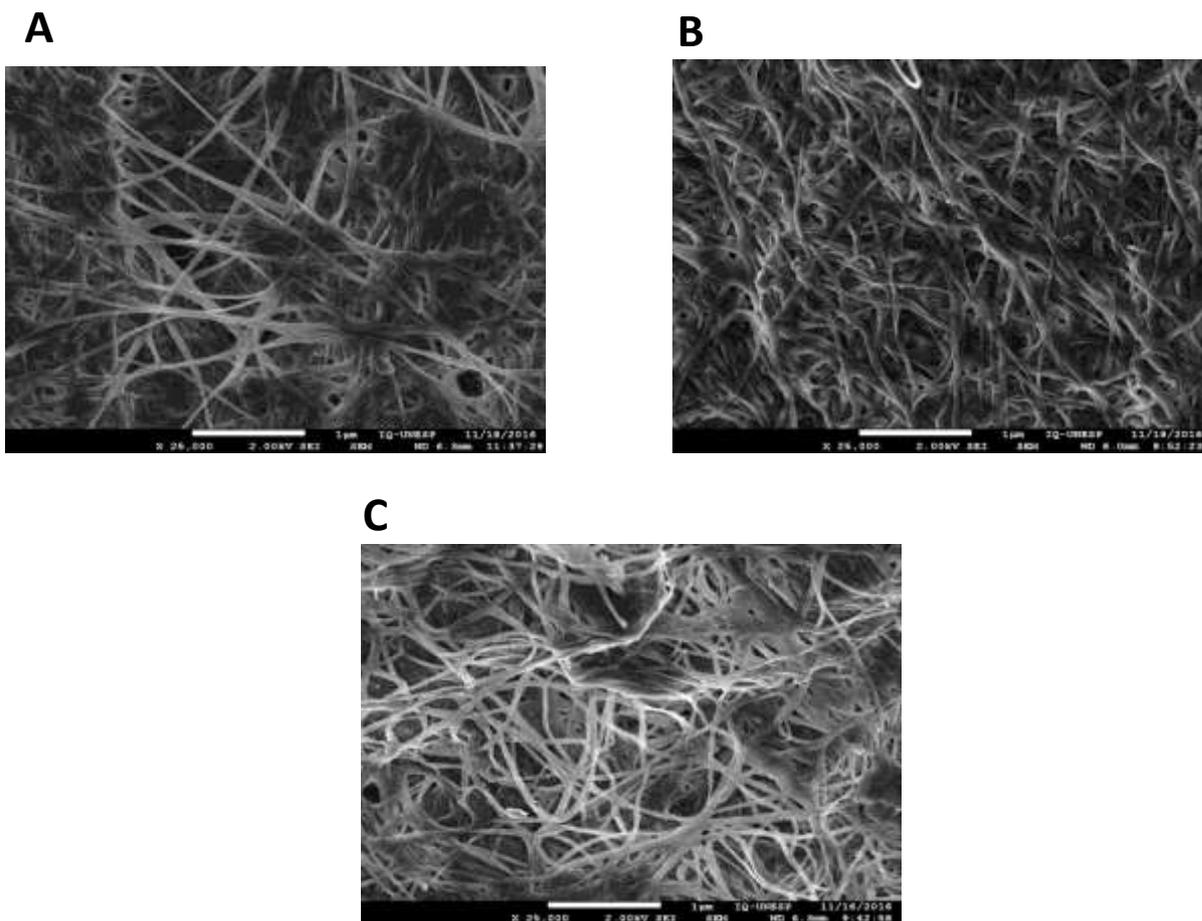


Figura 27. MEV das membranas de CB analisando as diferenças de tramas após aplicação da pressão seletiva em exposição à luz UV. Painei A (5 min.), Painei B (10 min.) e Painei C (30 min.).

Diante dos resultados obtidos nesta etapa dos experimentos, pode-se sugerir que as pressões seletivas (temperatura, pH e exposição à luz UV) influenciam significativamente o metabolismo bacteriano na produção de CB, e este fato está diretamente relacionado com a diferenciação morfológica das UFC, uma vez que todos os cultivos partiram das mesmas colônias, com as mesmas características morfológicas e do mesmo meio de cultivo FRU.

1.11. Caracterização das membranas de CB por FTIR e DRX após pressões seletivas.

As membranas de CB foram caracterizadas por FTIR e DRX para confirmar a identidade química das membranas e também para detectar qualquer alteração no grau de cristalinidade das membranas produzidas após os tratamentos por pressões seletivas. Os espectros FTIR das membranas de CB mostraram as características típicas de substratos

celulósicos para todas as amostras, com bandas em torno de 3350 cm^{-1} correspondentes ao estiramento de OH, $2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ correspondendo ao estiramento de ligação de C-H, 1160 cm^{-1} correspondendo ao estiramento de COC e $1035\text{-}1060\text{ cm}^{-1}$ correspondente ao estiramento de CO. Esses resultados indicam que as condições de estresse não afetaram a estrutura química das amostras, conforme esperado.

A celulose tem domínios cristalinos e amorfos para os quais as proporções dependem da fonte de carbono e condições de cultivo. Aqui, a análise por DRX foi realizada para avaliar se a pressão seletiva para a produção de CB afetou o índice de cristalinidade da celulose, uma vez que as propriedades da celulose são influenciadas pela disposição das moléculas dentro das fibras. O DRX para amostras de diferentes pressões seletivas mostrou o perfil típico e o grau de cristalinidade de CB. Os principais picos de difração foram encontrados em 2θ 14,7, 16,9 e 22,7 e atribuídos aos planos de difração 1 0 1, 1 0 $\bar{1}$ e 0 0 2, respectivamente. O grau de cristalinidade variou de 70 a 80%. No entanto, não foi possível estabelecer uma relação entre os parâmetros analisados, como o rendimento, a morfologia das colônias ou o arranjo das nanofibras CB com grau de cristalinidade. Além disso, não foi possível estabelecer uma relação entre a aplicação das pressões seletivas e o grau de cristalinidade das membranas de CB. A Figura 28 mostra os padrões FTIR (Painel A) e DRX (Painel B) das membranas CB obtidas após a pressão física (temperatura e exposição à luz UV) e químicas (pH).

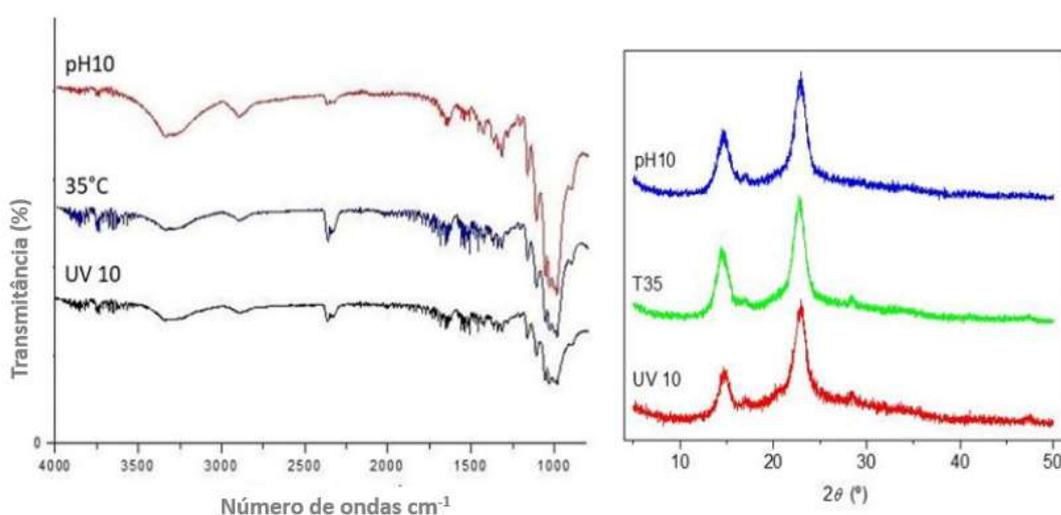


Figura 28 - Espectro FTIR: (Painel A) e difratogramas de raios X (Painel B) das membranas de CB produzidas após aplicações das diferentes pressões seletivas.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1. Conclusões

- As cepas de *G. hansenii* ATCC 23796 foram reativadas com sucesso e, a após produção de CB nas temperaturas de 21°C e 35°C o maior rendimento de produção foi na maior temperatura;
- Os meios de cultivo propostos neste trabalho (MS1 e MS2) apresentaram as melhores condições de cultivo, rendimento em massa seca, estrutura e suporte para liberação sustentada de fármacos, quando comparados com os meios propostos na literatura (Z, Y, HS e FRU) para a produção e aplicação da CB.
- A melhor DO para a produção de CB variou em relação aos diferentes meios, fato que pode estar relacionado à concentração e variedade da fonte de carbono;
- Para o meio MS1, foi obtido melhor resultado para o cultivo na DO correspondente à escala nefelométrica 1,0 de McFarland, enquanto que, para os meios MS2, FRU e HS os maiores rendimentos foram obtidos nas DO correspondentes, respectivamente, às escalas 5,0, 10,0 e 7,0.
- Os resultados obtidos nos testes de liberação sustentada de CRO e Ag-CLR sugerem que a membrana produzida nos meios MS1 e MS2 apresentam grande potencial para utilização como suporte de liberação de fármacos visando aplicação dessas membranas de CB como curativos de longa duração.
- Foram obtidas colônias com variantes fenotípicas após aplicação das pressões seletivas de temperatura, pH e UV;
- A produção de CB, após aplicação das pressões seletivas, apresentou rendimento em massa seca variável, o que pode estar relacionado com possíveis alterações de rota metabólica;
- O maior rendimento em produção em massa seca de membranas de CB foi obtido utilizando colônias obtidas após pressão seletiva a 35°C;
- A caracterização por MEV das UFC e das membranas de CB, produzidas após pressões seletivas, demonstraram a influência das variações das condições químicas (temperatura e pH) e física (UV) na alteração da morfologia das UFC, bem como no grau de entrelaçamento, espessura e disposição das fibras.

2. Perspectivas

- Estudos moleculares futuros envolvendo genes relacionados às vias metabólicas basais e de produção de CB
- Produção de CB, em larga escala, com as variantes de UFC que apresentaram maior rendimento em massa seca obtidas após aplicação das pressões seletivas química e físicas;
- Produção de curativos de liberação sustentada de fármacos e complexos metálicos pelas membranas de CB com melhores resultados nos testes de liberação, para teste *in vivo*.

Referências Bibliográficas

- Abeer, M.M., Mohd Amin, M.C.I. & 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.
- Almeida, D., 2008. Crescimento do *Acetobacter xylinum* (ATCC 23769) e a produção de celulose bacteriana. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 2(1), pp.95–103.
- Bae, S.O. & Shoda, M., 2005. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(1), pp.45–51.
- Barud, H.S. et al., 2011. Antimicrobial Bacterial Cellulose-Silver Nanoparticles Composite Membranes. *Journal of Nanomaterials*, 2011.
- Barud, H.S. et al., 2008. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. *Materials Science & Engineering C*, 28, pp.515–518.
- Borzani, W. & de Souza, S.J., 1995. Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media. *Biotechnology Letters*, 17(11), pp.1271–1272.
- Brown, R.M., 2004. Cellulose Structure and Biosynthesis : what is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science*, 42, pp.487–495.
- Carvalho, M.A. et al., 2013. A silver complex with tryptophan : Synthesis , structural characterization , DFT studies and antibacterial and antitumor assays in vitro. *Journal of molecular structure*, 1031, pp.125–131. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.07.044>.
- Castro, C. et al., 2012. Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus. *Carbohydrate Polymers*, 89(4), pp.1033–1037.
- Chawla, P.R. et al., 2009. Microbial cellulose: Fermentative production and applications (Review). *Food Technology and Biotechnology*, 47(2), pp.107–124.
- Czaja, W. et al., 2006. Microbial cellulose — the natural power to heal wounds.

- Biomaterials*, 27, pp.145–151.
- Czaja, W.K. et al., 2007. The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, 8(1), pp.1–12.
- Dahman, Y., Jayasuriya, K.E. & Kalis, M., 2010. Potential of biocellulose nanofibers production from agricultural renewable resources: Preliminary study. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, pp.1647–1659.
- Delmer, D.P., 1987. Cellulose biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 38, pp.259–290.
- Donini, Í. a N. et al., 2010. Bioss ntese e recentes avan os na produ o de celulose bacteriana. *Ectetica Quimica*, 35(4), pp.165–178.
- Dugan, J.M., Gough, J.E. & Eichhorn, S.J., 2013. Bacterial cellulose scaffolds and cellulose nanowhiskers for tissue engineering. *Nanomedicine (London, England)*, 8(2), pp.287–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23394157>.
- Eichhorn, S.J. et al., 2010. Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites, *Journal of Materials Science*, 45(1), pp. 1-33
- Eichhorn, S.J. & Young, R.J., 2001. The Young’s modulus of a microcrystalline cellulose. *Cellulose*, 8(3), pp.197–207.
- Einfeldt, L. et al., 2005. Peracetylated cellulose : end group modification and structural analysis by means of 1 H-NMR spectroscopy. *Cellulose* , pp.15–24.
- El-sousi, S. et al., 2013. Hydroxypropylmethylcellulose films for the ophthalmic delivery of diclofenac sodium. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* , pp.193–200.
- Evans, B.R. et al., 2003. Palladium-bacterial cellulose membranes for fuel cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(7), pp.917–923.
- Fontana, J.D. et al., 1990. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24–25(1), pp.253–264.
- Fu, L., Zhang, J. & Yang, G., 2013. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), pp.1432–1442. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.071>.

- Ha, J.H. et al., 2011. Bacterial cellulose production from a single sugar linked glucuronic acid-based oligosaccharide. *Process Biochemistry*, 46(9), pp.1717–1723. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.05.024>.
- Halib, N., Amin, M.C.I.M. & Ahmad, I., 2012. Physicochemical Properties and Characterization of Nata de Coco from Local Food Industries as a Source of Cellulose. *Sains Malaysiana*, 41(2), pp.205–211.
- Hestrin, S. & Schramm, M., 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose*. *Biochemical Journal*, 58(2), pp.345–352.
- Hirai, A., Tsuji, M. & Horii, F., 1997. Culture conditions producing structure entities composed of Cellulose I and II in bacterial cellulose. *Cellulose*, 4, pp.239–245.
- Iguchi, M., Yamanaka, S. & Budhiono, a., 2000. Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, 35(2), pp.261–270.
- Jean B. Patel, Franklin R., J.A. & Institute, C. and L.S., 2014. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement*,
- Jonas, R. & Farah, L.F., 1998. Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1–3), pp.101–106. Available at:
- Jung, H., Jeong, J., et al., 2010. Bioresource Technology Influence of glycerol on production and structural – physical properties of cellulose from *Acetobacter* sp . V6 cultured in shake flasks. *Bioresource Technology*, 101(10), pp.3602–3608.
- Jung, H., Lee, O., et al., 2010. Production and Characterization of Cellulose by *Acetobacter* sp . V6 Using a Cost-Effective Molasses – Corn Steep Liquor Medium. *Appl Biochem Biotechnol* , pp.486–497.
- Jung, R. et al., 2009. Antimicrobial properties of hydrated cellulose membranes with silver nanoparticles. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 20(3), pp.311–24.
- Keshk, S. & Sameshima, K., 2006. Influence of lignosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, pp.4–8.

- Keshk, S. & Sameshima, K., 2006. The utilization of sugar cane molasses with / without the presence of lignosulfonate for the production of bacterial cellulose. *Appl Microbiol Biotechnol*, pp.291–296.
- Klemm, D. et al., 2005. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie - International Edition*, 44(22), pp.3358–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15861454>.
- Kongruang, S., 2008. Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* Strains from Agricultural Waste Products. , pp.245–256.
- Kukhareenko, O. et al., 2014. Promising low cost antimicrobial composite material based on bacterial cellulose and polyhexamethylene guanidine hydrochloride. *European polymer journal*, 60, pp.247–254.
- 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.
- 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.
- Lee, K.Y. et al., 2014. More than meets the eye in bacterial cellulose: Biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromolecular Bioscience*, 14(1), pp.10–32.
- Lustri, W.R. et al., 2017. Spectroscopic characterization and biological studies in vitro of a new silver complex with furosemide: Prospective of application as an antimicrobial agent. *Journal of Molecular Structure*, 1134(2017), pp.386–394.
- Lustri, W. R. et al, 2013. Processo de obtenção e utilização de membrana de celulose bacteriana em bicamada como biocurativo de liberação sustentada de fármacos e suporte para crescimento celular. *Depósito de patente*.
- Lustri, W.R. et al., 2015. Microbial Cellulose — Biosynthesis Mechanisms and Medical Applications. In *Cellulose- Fundamental Aspects and Current Trends*. pp. 133–157.

- Machado, R.T.A. et al., 2016. Komagataeibacter rhaeticus as an alternative bacteria for cellulose production. *Carbohydrate Polymers*, 152, pp.841–849.
- Masaoka, S., Ohe, T. & Sakota, N., 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75(1), pp.18–22.
- 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, pp.576–583.
- Mohammadkazemi, F. et al., 2015. Manufacturing of bacterial nano-cellulose reinforced fiber À cement composites. *Construction and Building Materials*, 101, pp.958–964.
- Moritz, S. et al., 2014. Active wound dressings based on bacterial nanocellulose as drug delivery system for octenidine. *International Journal of Pharmaceutics*, 471(1–2), pp.45–55. Available at:
- Nguyen, V.T. et al., 2010. Spontaneous mutation results in lower cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. *Carbohydrate Polymers*, 80, pp.337–343.
- Oliveira, A. & Junior, V.S., 2010. Study of bacteria *Gluconobacter* sp.: isolation, purification, phenotypic and molecular identification. *Ciência e Tecnologia*, 30(1), pp.106–112.
- de Oliveira Barud, H.G. et al., 2016. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 153.
- Pacheco, C. et al., 2004. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43270103>.
- Paul, F., Morin, A. & Monsan, P., 1986. Microbial polysaccharides with actual potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 4(2), pp.245–259.
- Phisalaphong, M. & Jatupaiboon, N., 2008. Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose – chitosan film. , 74, pp.482–488.
- Pietak, A. et al., 2007. Atomic force microscopy characterization of the surface wettability of natural fibres. *Applied Surface Science*, 253(7), pp.3627–3635.

- Pinto, R.J.B. et al., 2009. Antibacterial activity of nanocomposites of silver and bacterial or vegetable cellulosic fibers. *Acta Biomaterialia*, 5(6), pp.2279–2289.
- Pourreza, N. et al., 2015. Biosensors and Bioelectronics Green in-situ synthesized silver nanoparticles embedded in bacterial cellulose nanopaper as a bionanocomposite plasmonic sensor. , 74, pp.353–359.
- Poyrazolu Çoban, E. & Biyik, H., 2011. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HBB5. *African Journal of Biotechnology*, 10(27), pp.5346–5354. Available at: <http://www.academicjournals.org/AJB>.
- Recouvreux, 2008. Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos. *Tese de doutorado em Engenharia Química Universidade Federal de Santa Catarina*, Único, p.145.
- Recouvreux, D.O.S. et al., 2011. Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*, 31(2), pp.151–157.
- Ross, P., Mayer, R. & Benziman, M., 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological reviews*, 55(1), pp.35–58.
- Ruka, D.R., Simon, G.P. & Dean, K.M., 2012. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. , 89, pp.613–622.
- Ruka, D.R., Simon, G.P. & Dean, K.M., 2013. In situ modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), pp.1717–1723.
- Saxena, I.M. & Brown, R.M., 1995. Identification of a second cellulose synthase gene (acsAII) in *Acetobacter xylinum*. *Journal of bacteriology*, 177(18), pp.5276–83.
- Shah, J. & Brown, R.M., 2005. Towards electronic paper displays made from microbial cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(4), pp.352–355.
- Shah, N. et al., 2013. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. *Carbohydrate Polymers*, 98, pp.1585–1598.

- Shah, N., Ha, J.H. & Park, J.K., 2010. Effect of Reactor Surface on Production of Bacterial Cellulose and Water Soluble Oligosaccharides by *Gluconacetobacter hansenii*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, pp.110–118.
- 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*, 106, pp.264–269.
- Siqueira, G., Bras, J. & Dufresne, A., 2009. Cellulose Whiskers versus Microfibrils: Influence of the Nature of the Nanoparticle and its Surface Functionalization on the Thermal and Mechanical Properties of Nanocomposites. *Biomacromolecules*, 10 (2), pp.425–432.
- Son, H.-J. et al., 2001. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp.A9 in shaking cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 33(1), p.1.
- Souza, D.M. de & Garcia-Cruz, C.H., 2004. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. *Semina: Ciências Agrárias*, 25(4), pp.331–340.
- 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*, 435(1), pp.83–87.
- Tuan, V. et al., 2010. Spontaneous mutation results in lower cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. *Carbohydrate Polymers*, 80(2), pp.337–343.
- Ul-islam, M., Khan, T. & Kon, J., 2012. Nanoreinforced bacterial cellulose – montmorillonite composites for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 89(4), pp.1189–1197.
- Ummartyotin, S. & Manuspiya, H., 2014. A critical review on cellulose: From fundamental to an approach on sensor technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, pp.402–412.
- Wei, B., Yang, G. & Hong, F., 2011. Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties. *Carbohydrate Polymers*, 84(1),

pp.533–538.

- Williamst, W.S. & Cannon, R.E., 1989. Alternative Environmental Roles for Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum*. *Applied and environmental microbiology*, 55(10), pp.2448–2452.
- De Wulf, P., Joris, K. & Vandamme, E.J., 1996. Improved cellulose formation by an *Acetobacter xylinum* mutant limited in (keto)gluconate synthesis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 67(4), pp.376–380.
- 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.
- Yang, G. et al., 2012. Antimicrobial activity of silver nanoparticle impregnated bacterial cellulose membrane: Effect of fermentation carbon sources of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), pp.839–845.
- 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.