

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
BACHARELADO EM QUÍMICA**

PRISCILLA VICENTE LOPES

**PREPARO E ENSAIO ANTIMICROBIANO DE BIOPOLÍMERO
FORMADO POR MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA
ASSOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CURITIBA
2019**

PRISCILLA VICENTE LOPES

**PREPARO E ENSAIO ANTIMICROBIANO DE BIOPOLÍMERO
FORMADO POR MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA
ASSOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do curso superior de Bacharelado em Química do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBi – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito para obtenção de título de Bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Roberta Carolina Pelissari Rizzo Domingues

**CURITIBA
2019**

PRISCILLA VICENTE LOPES

**PREPARO E ENSAIO ANTIMICROBIANO DE BIOPOLÍMERO
FORMADO POR MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA
ASSOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, campus Curitiba. Após deliberação, a banca examinadora composta pelos membros a seguir considerou o trabalho aprovado:

Profa. Dra. Marlene Soares

UTFPR-CT

Profa. Dra. Maria Giovana Blinder Pagnoncelli

UTFPR-CT

Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto (orientador)

UTFPR-CT

Profa. Dra. Roberta Carolina Pelissari Rizzo Domingues (coorientadora)

UTFPR-CT

Prof. Dr. Luiz Marcos de Lira Faria

(coordenador de curso)

Curitiba, 10 de Julho de 2019.

*Dedico este trabalho a todas as
pessoas que contribuem para o
desenvolvimento tecnológico, científico
e humano.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus pelo consolo e forças para vencer cada obstáculo durante minha jornada acadêmica. Por me presentear com saúde e, mesmo na ausência dela, me dar condições de executar cada tarefa.

Gostaria de agradecer à minha família, principalmente ao meu pai, Francisco por todo o incentivo e apoio em todos os momentos. À minha, mãe, Vânia, por ser minha inspiração para cursar uma faculdade, mesmo perante todas as adversidades; aos meus irmãos, Gabriel e Letícia, por tantas conversas, desabafos e risadas sobre o cotidiano acadêmico, à minha “boadrasta”, Ilza, por tantas vezes ouvir meus desabafos, choros e ser um grande ombro amigo.

Agradecer também ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto por toda a paciência e boa vontade durante a execução deste projeto, indo acompanhar de perto cada etapa do mesmo, mesmo sendo final de semana. Agradeço também à minha coorientadora, Prof. Dra. Roberta Carolina Pelissari Rizzo Domingues por todas as contribuições, ao Prof. Dr. Marcus Vinicius de Liz por disponibilizar espaço e equipamentos em seu laboratório, possibilitando a execução deste projeto, ao Prof. Dr. José D. Fontana por fornecer gentilmente, a cepa necessária para a produção de celulose bacteriana. Às professoras, Prof. Dra. Marlene Soares e Prof. Dra. Giselle Maria Maciel pela avaliação e contribuições valiosas na primeira etapa deste projeto. Agradecer previamente às professoras, Prof. Dra. Maria Giovana Blinder Pagnoncelli e Prof. Dra. Marlene Soares por aceitarem compor a banca de avaliação.

Ao Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais da Universidade (CMCM) e ao Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela ajuda com as caracterizações.

Aos meus colegas de laboratório, Egon e Fernanda, por inúmeras dicas valiosas, ensinamentos e pela companhia.

Um agradecimento mais que especial aos meus amigos Jessika, Rhaissa, Camila, Luiz, Luanne e Liliane, representando todos os amigos e colegas ganhos nessa jornada, tornando a vida mais leve e garantindo bons momentos, sofrendo e superando cada obstáculo juntos e pelas garantidas risadas.

Ao meu namorado e amigo, Vinnicius, por toda a paciência com meus estresses, por ajudar com as distrações, me lembrando sempre que o descanso faz parte do trabalho e por me incentivar a sempre buscar mais.

A Pró-Reitoria de Relações Empresariais e Comunitárias e Pró-Reitoria de Graduação e Educação Profissional da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela obtenção de apoio financeiro à execução deste trabalho de conclusão de curso.

Meus sinceros agradecimentos a todos os professores e funcionários que, em sinergia, mantêm nossa Universidade de portas abertas, proporcionando um espaço de grande riqueza intelectual e humana.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar, escritor)

RESUMO

LOPES, Priscilla Vicente. **Preparo e ensaio antimicrobiano de biopolímero formado por membrana de celulose bacteriana associada a nanopartículas de dióxido de titânio.** 49 f. Trabalho de conclusão de curso. Bacharelado em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

O elevado interesse pela nanotecnologia tem contribuído para o avanço na pesquisa dos nanomateriais celulósicos. A celulose bacteriana (CB) é um polissacarídeo extracelular, secretado por determinadas espécies de bactérias, tal como a *Gluconacetobacter xylinus*, que apresenta propriedades interessantes, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, alta pureza, resistência da fibra e elevada retenção de água, com diversas aplicações em áreas da saúde, alimentos, cosmética, eletrônica, têxtil, dentre outras. Já as nanopartículas de dióxido de titânio (NPs-TiO₂) possuem diversas propriedades como estabilidade química, grande atividade catalítica, além de possuir características antimicrobianas com possibilidade de incorporação em polímeros para a geração de novos materiais com novas propriedades. No entanto, são raros os estudos realizados com NPs-TiO₂ integradas com a celulose produzida por bactérias. Esse projeto tem como objetivo o preparo e ensaio de atividade antimicrobiana de um biopolímero formado por membrana de celulose bacteriana associada a nanopartículas de dióxido de titânio. Para isso foram produzidas membranas de celulose bacteriana utilizando *Gluconacetobacter xylinus* em meio contendo glicerol como principal fonte de carbono, seguido pela incorporação de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) em banho ultrassônico e posterior ensaio antimicrobiano frente às bactérias *Escherichia coli* com fotoativação em meio líquido em câmara com luz ultravioleta (UV) e *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* sem fotoativação em meio sólido. A presença e incorporação das partículas de TiO₂ na membrana foi confirmada por espectroscopia FTIR. Desta forma, devido à natureza não bactericida de biopolímeros puros avaliou-se a funcionalização da membrana de celulose com nanopartículas de dióxido de titânio, observando inibição do crescimento microbiano para CB-TiO₂ na ausência (inibição de 68,0%) e, principalmente, na presença de radiação UV-A (inibição de 98,5%).

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. Biocompósito. Fotocatálise.

ABSTRACT

LOPES, Priscilla Vicente. **Production and antimicrobial assay of biopolymer formed by bacterial cellulose membranes aggregated to titanium dioxide nanocomposites.** 49 p. Graduation final project. Bachelor degree of Chemistry. Federal Technological University of Parana. Curitiba, 2019.

The high interest in nanotechnology has contributed to the advancement in the research of cellulosic nanomaterials. Bacterial cellulose (CB) is an extracellular polysaccharide, secreted by certain species of bacteria, such as *Gluconacetobacter xylinus*, which has interesting properties such as biocompatibility, biodegradability, high purity, fiber resistance and water retention, with several applications in areas of health, food, cosmetics, electronics, textiles, among others. The titanium dioxide nanocomposites (NPs-TiO₂) have several properties such as chemical stability, great catalytic activity, and have antimicrobial properties with the possibility of incorporation into polymers for the generation of new materials with new properties. However, studies with NPs-TiO₂ integrated with cellulose produced by bacteria are scarce. This project aims to prepare and test the antimicrobial activity of a biopolymer formed by bacterial cellulose membrane aggregated to titanium dioxide nanocomposites. In this regard, bacterial cellulose membranes were produced using *Gluconacetobacter xylinus* in medium containing glycerol as the main source of carbon, followed by the incorporation of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in an ultrasonic bath and subsequent antimicrobial assay against *Escherichia coli* bacteria with liquid activation in ultraviolet light (UV) chamber and *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* without photoactivation in solid medium. The presence and incorporation of TiO₂ particles in the membranes was confirmed by FTIR spectroscopy. Thus, due to the non-bactericidal nature of pure biopolymers, the functionalization of the cellulose membrane with titanium dioxide nanocomposites was evaluated, with inhibition of microbial growth for CB-TiO₂ in the absence (68.0% inhibition) and, mainly, in the presence of UV-A radiation (98.5% inhibition).

Key words: Antibacterial activities. Biocomposites. Photocatalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de monômero e polímero	17
Figura 2. Estrutura molecular da celulose demonstrando ligações de hidrogênio intra e intermolecular.	18
Figura 3. Estrutura cristalina de polimorfos de TiO ₂	20
Figura 4. Fluxograma representando a metodologia do projeto.	23
Figura 5. Esquema demonstrando etapas de produção de celulose bacteriana.	24
Figura 6. Demonstração de placa preparada para avaliação de atividade antimicrobiana em meio sólido.	26
Figura 7. Sistema para a realização dos ensaios de fotocatalise.	28
Figura 8. Análise em reator fotoquímico. (a) Montagem do aparato experimental ainda com a lâmpada apagada (b) Análise em curso em reator fotoquímico.	28
Figura 9. Esquema demonstrando etapas das análises realizadas.....	30
Figura 10. Membranas de celulose bacteriana obtidas a partir de cultivo de <i>G. xylinus</i> em meio HS modificado, incubadas em condição estática a 28,0°C por 5-7 dias em (A) placas de cultivo de seis poços e (B) avulsas para experimentos posteriores. ...	32
Figura 11. Celulose bacteriana com incorporação de nanopartículas de dióxido de titânio por banho ultrassônico. (A) Sem contraste com a luz e (B) em contraste com a luz.....	33
Figura 12. Membranas de CB-TiO ₂ secas a 80 °C por 60 minutos em gel dryer.....	34
Figura 13. Comparação da celulose pura (CB) com o nanocompósito CB-TiO ₂ testados através de análise por FTIR.....	35
Figura 14. Placas preparadas para avaliação de atividade antimicrobiana perante <i>S. aureus</i> ATCC 6538 em meio sólido contendo ágar nutriente, com discos circulares de CB-TiO ₂ antes (A) e depois de 24 horas de incubação à 28,0°C (B).	36
Figura 15. Placas utilizadas após cada tratamento para contagem de microrganismos viáveis.	38
Figura 16. Gráfico correlacionando cada um dos tratamentos com o crescimento observado em UFC·mL ⁻¹	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições e duração de cada uma das análises de inibição do crescimento de <i>E. coli</i> realizados em duplicata (n=2).....	29
Tabela 2. Dados de UFC·mL ⁻¹ para cada análise realizada.....	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	Biopolímeros	17
3.1.1	Celulose Vegetal e Celulose Bacteriana	18
3.2	Nanopartículas de dióxido de titânio	20
4	METODOLOGIA.....	23
4.1	Produção de celulose bacteriana	23
4.2	Incorporação de nanopartículas de TiO₂ à celulose bacteriana	25
4.3	Caracterização da NPs TiO₂-CB	25
4.3.1	Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	25
4.4	Avaliação de atividade antimicrobiana	26
4.4.1	Avaliação de atividade antimicrobiana com discos de CB impregnados com TiO ₂ em meio sólido	26
4.4.2	Avaliação de atividade antimicrobiana em meio líquido com fotoativação ...	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5.1	Produção de celulose bacteriana	31
5.2	Incorporação de nanopartículas de TiO₂ à celulose bacteriana	33
5.3	Caracterização da NPs CB-TiO₂	34
5.3.1	Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	34
5.4	Avaliação de atividade antimicrobiana	36
5.4.1	Avaliação de atividade antimicrobiana com discos de CB impregnados com TiO ₂ em meio sólido	36
5.4.2	Avaliação de atividade antimicrobiana em meio líquido com fotoativação ...	37
6	CONCLUSÃO.....	43
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de polímeros sintéticos é considerado um dos grandes avanços do século XX, devido à multiplicação de suas possibilidades de uso, não apenas na indústria, mas no cotidiano. Estes polímeros sintéticos são obtidos principalmente a partir de petróleo e são criados para funções específicas. Todavia, o aumento dos preços do petróleo, a instabilidade da situação geopolítica das regiões que detêm as grandes reservas mundiais e o consenso sobre a necessidade de diminuição das emissões atmosféricas, impulsionaram a produção de polímeros feitos a partir de matérias-primas renováveis (VALERO-VALDIVIESO; ORTEGÓN; USCATEGUI, 2013). Os biopolímeros, em sua grande maioria, provêm de recursos renováveis e mostram-se como uma alternativa aos polímeros sintéticos.

Dentre os biopolímeros conhecidos destaca-se a celulose, que é um dos polímeros biodegradáveis mais disponíveis no planeta, sendo o principal componente estrutural de plantas. Além de plantas, algas, algumas bactérias são capazes de sintetizar celulose a partir de uma variedade de fontes de carbono (ANTÔNIO et al., 2012). Todavia, uma das vantagens da celulose produzida por bactérias é que ela apresenta-se pura, enquanto a de origem vegetal (excetuando-se o algodão), apresenta lignina, hemicelulose na sua constituição, requerendo, assim, diversos tratamentos para purificação enquanto a celulose bacteriana (CB) pode ser purificada apenas com hidróxido de sódio (NaOH), evitando o uso excessivo de reagentes para tal finalidade (MANEERUNG, TOKURA; RUJIRAVANIT, 2008).

Celulose bacteriana (CB) apresenta outras propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, natureza não tóxica, elevada cristalinidade, boa resistência mecânica, boa retenção de água, tornando-a interessante para aplicação em diversas áreas como área de cosmética, saúde, alimentos, têxtil, eletrônica (FISCHER et al, 2017; MANEERUNG, TOKURA; RUJIRAVANIT, 2008) Entretanto, a CB não apresenta como propriedade a atividade antimicrobiana intrínseca, o que gera a necessidade da combinação com outros compostos.

Grande parte dos nanomateriais, tanto metais quanto óxidos metálicos, como prata, ouro, óxidos de zinco, magnésio, dióxido de titânio, dentre outros, apresentam ação antibacteriana e antifúngica (KHAN, S. et al, 2015). O dióxido de

titânio (TiO₂), é usado como fotocatalisador, absorvendo radiação e gerando espécies que causam inativação microbiana (MANAHAM, 2013; SHIM et al, 2016).

Grande parte dos trabalhos envolvendo TiO₂ como fotocatalisador são realizados com as nanopartículas (NPs) em suspensão e sob mistura completa, o que confere maior área superficial para a reação. Todavia, há perda do catalisador para o meio, o que pode elevar os custos do processo. Uma das maneiras de minimizar tal perda é a imobilização das nanopartículas em diferentes materiais que tenham grande capacidade de adsorção e sejam porosos, tais como materiais cerâmicos e polímeros (BORGES et al, 2016).

Alguns trabalhos demonstram sucesso na associação de outros biopolímeros e nanomateriais à celulose bacteriana, para mudar suas propriedades ou melhorá-las em relação a determinada característica (KHAN, S. et al, 2015). Como exemplos, nanopartículas de prata com diâmetro médio de 1,5 nm foram uniformemente distribuídas em superfície de CB a partir de uma reação redox *in situ* na fase líquida entre AgNO₃ e NaBH₄, como demonstrado na reação 1:



Essas nanofibras híbridas apresentaram propriedade antimicrobiana eficiente frente *E. coli*, confirmada pela redução das bactérias em 99,2% (HUANG et al, 2013).

Outro estudo, associando NPs de ZnO à CB mostrou atividade antibacteriana perante à bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e às Gram-negativas *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* e *Pseudomonas aeruginosa* obtendo redução de 94,3%, 90%, 90,9% e 87,4%, respectivamente (KHALID et al, 2016).

Compósitos de nanopartículas de dióxido de titânio e celulose bacteriana também apresentam atividade antimicrobiana perante *E. coli*. Todavia, a inibição observada é maior quando se utiliza NPs de TiO₂ sem a combinação com a celulose. Esse fato é observado devido à natureza livre (não ligada) das nanopartículas em comparação com as nanopartículas anexadas ao compósito (KHAN, S. et al, 2015).

Desta forma pretende-se estudar uma melhor forma para aumentar a superfície de contato das nanopartículas de TiO₂ com os microrganismos em questão para um possível aumento da inibição. Além disso, a maioria das pesquisas com

compósitos envolve NPs de prata, sendo escassos trabalhos com outros tipos de nanopartículas.

Diante disso, neste trabalho foi estudada a utilização de nanopartículas de dióxido de titânio com o objetivo de acrescentar propriedade antibacteriana à membrana de celulose bacteriana, aumentando a diversidade de possíveis aplicações.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Preparar biopolímero a partir de membrana de celulose bacteriana associada a nanopartículas de dióxido de titânio e testar sua eficiência antimicrobiana frente a *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

2.2 Objetivos específicos

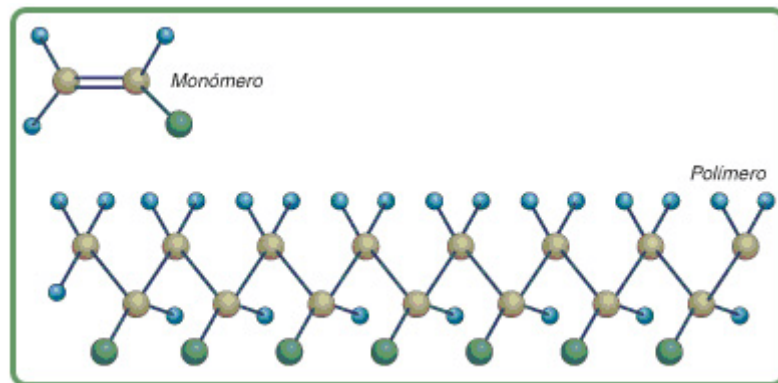
- Produzir de celulose bacteriana utilizando *Gluconacetobacter xylinus* em meio contendo glicerol como principal fonte de carbono;
- Incorporar nanopartículas de TiO_2 à celulose em banho ultrassônico;
- Confirmar a incorporação do TiO_2 à celulose por meio de espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica de varredura;
- Realizar ensaio de atividade antimicrobiana em meio sólido sem fotoativação e meio líquido com fotoativação utilizando *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 como organismos modelo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Biopolímeros

A palavra “polímero” origina-se do grego *poli* (muitos) e *mero* (unidade de repetição) (CANEVAROLO, 2006). Logo, polímeros são substâncias orgânicas ou inorgânicas, de alta massa molar, constituídas de moléculas caracterizadas pela repetição de uma ou mais espécies de átomos ou grupos de átomos (unidades constitucionais denominadas monômeros) ligados covalentemente uns aos outros em quantidade suficiente para formação de uma macromolécula (CANEVAROLO, 2006; GAUTO; ROSA, 2013). Uma representação de monômero e polímero pode ser observada na Figura 1.

Figura 1. Representação de monômero e polímero



Fonte: (Betaeq, 2018).

Os polímeros podem ser classificados por diversos critérios, tais como sua origem, estrutura física, técnica de polimerização utilizada, dentre outros. No que se diz respeito à sua natureza, podem ser classificados como naturais ou sintéticos. Os biopolímeros são polímeros naturais produzidos por seres vivos ou obtidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis como materiais lignocelulósicos (a partir de milho e cana-de-açúcar, por exemplo), seda, celulose quitina, dentre outros (BRITO et al., 2011; CAREY, 2011; PAULO, 2014).

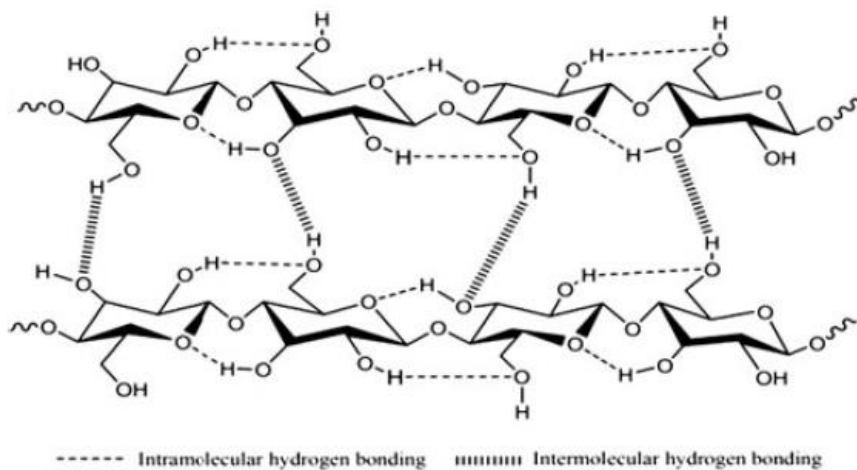
Uma grande vantagem do uso dos biopolímeros é que alguns apresentam degradação facilitada no ambiente que resulta da ação de microrganismos de ocorrência natural, transformando o material em moléculas menores, diminuindo o impacto ambiental (PAULO, 2014).

Os biopolímeros são amplamente utilizados como material de suporte em pesquisa, principalmente na área biomédica, devido à sua alta biocompatibilidade e natureza não tóxica (KHAN, S.T. et al, 2015). Porém, não apresentam certas propriedades como a antimicrobiana, seja bactericidas (quando causa a morte de bactérias), bacteriostáticos (que inibem o crescimento das bactérias no meio) ou bacteriolíticos (além de matar as bactérias também eliminam as células já mortas através do processo de lise celular). Tal propriedade em polímeros puros pode ser adicionada com sua associação a outros materiais com essa característica.

3.1.1 Celulose Vegetal e Celulose Bacteriana

Celulose é um polímero natural de cadeia longa $(C_6H_{10}O_5)_n$ encontrada como constituinte principal na composição de paredes celulares de vegetais. É formada por unidades de glicose conectadas por ligações glicosídicas β -1-4 (MADIGAN et al, 2010). Sua estrutura molecular pode ser visualizada na Figura 2.

Figura 2. Estrutura molecular da celulose demonstrando ligações de hidrogênio intra e intermolecular.



Fonte: (HUANG et al., 2014).

A fonte natural de celulose mais explorada comercialmente é a celulose vegetal, proveniente de diversas espécies de plantas como o eucalipto, para atender à demanda da indústria do papel e celulose, indústria têxtil, aplicações médicas e para utilização em agentes de reforço. No entanto, em plantas, além de celulose encontra-se hemicelulose, lignina, pectina, entre outros polímeros na composição da parede celular de plantas, que em um primeiro momento não são de interesse para tais indústrias, necessitando, então, separá-las do material de interesse o que gera um custo adicional ao processo. Uma exceção a isso, quando se trata de celulose de origem vegetal, é o algodão que apresenta porcentagem de conteúdo de 90% de celulose em sua constituição (HUANG et al., 2014).

A celulose também pode ser obtida de algas marinhas, animais marinhos e algumas bactérias acéticas, como a *Gluconacetobacter xylinus*, anteriormente *Acetobacter xylinus*, bactéria Gram-negativa pertencente à família *Acetobacteraceae* (CHÁVEZ et al, 2004). Essa espécie apresenta-se como um microrganismo não patogênico, aeróbio estrito, ou seja, a presença de oxigênio é essencial ao organismo e é conhecido por produzir nanofibras de celulose na forma de película na interface líquido-ar no meio de cultivo. Para a bactéria a CB funciona como mecanismo de flotação, permitindo ao microrganismo permanecer nessa interface líquido/ar para obter oxigênio com maior facilidade. Além disso a CB atua como barreira física protegendo a bactéria da radiação ultravioleta e aumenta a capacidade higroscópica do meio, permitindo a retenção de umidade e prevenindo a desidratação do substrato (DONINI et al., 2010).

A síntese de celulose bacteriana por *G. xylinus* constitui um complexo processo que envolve três etapas principais: a primeira etapa refere-se à polimerização dos resíduos de glicose em 1,4-glucana, a segunda etapa corresponde à secreção extracelular das cadeiras lineares e a terceira corresponde à cristalização e organização das cadeias de glucanas por meio de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals dispostas hierarquicamente em tiras (DONINI et al., 2010).

A celulose formada pelas bactérias acéticas não difere significativamente celulose vegetal, exceto pelo fato de ser pura, não estando associada a outros polímeros, como hemiceluloses, ligninas e pectina (MADIGAN et al., 2010). Além disso, as fibras em dimensões nanométricas conferem à celulose bacteriana propriedades distintas onde destacam-se a alta resistência mecânica e à tração e a possibilidade de inserções de materiais para obtenção de compósitos, que

podem ser realizadas “*in situ*” durante o cultivo do microrganismo (DONINI et al., 2010).

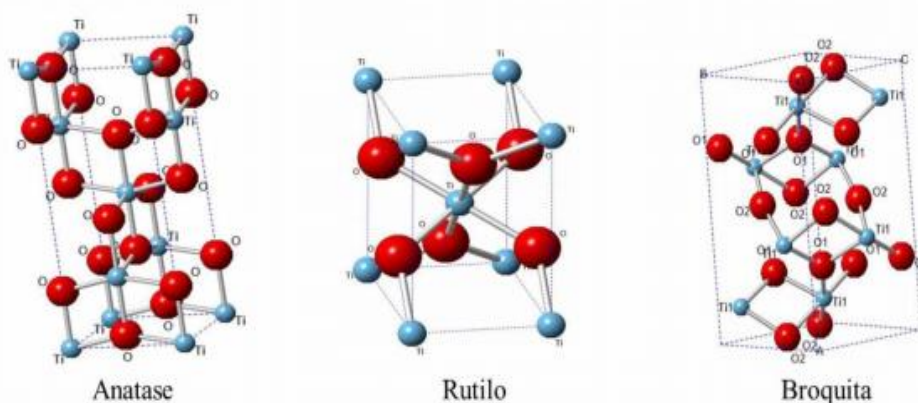
Apesar dessas propriedades únicas, a celulose bacteriana não apresenta propriedades antibacterianas intrínsecas, o que gera a necessidade de combinação com outros materiais para a aquisição desta característica (MANEERUNG; TOKURA; RUJIRAVANIT, 2008).

3.2 Nanopartículas de dióxido de titânio

O dióxido de titânio, também conhecido como titânio (IV) ou titânia é o óxido natural de titânio com fórmula química TiO_2 . É um composto largamente utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia, é quimicamente estável, não apresenta toxicidade ao manipulador, apresenta custo relativamente baixo e uma das suas aplicações de destaque é como fotocatalisador (KHAN, S. et al., 2015; SALEIRO et al., 2010; SANTOS et al., 2012;).

Dependendo de como a titânia é preparada, pode apresentar três estruturas cristalinas principais: anatase, rutilo e broquita (Figura 3) que são produzidas comercialmente, que apresentam diferentes propriedades catalíticas, sendo o primeiro mais empregado devido à sua maior reatividade (SALEIRO et al., 2010; SANTOS et al., 2010).

Figura 3. Estrutura cristalina de polimorfos de TiO_2 .



Fonte: (SANTOS, 2017).

Compostos baseados em TiO_2 têm sido estudados desde o início dos anos 70 devido aos seus efeitos benéficos na degradação de poluentes e na inativação microbiana. Em diversos estudos sobre o dióxido de titânio no campo da inativação microbiana, o enfoque foi no papel das várias espécies reativas de oxigênio e o efeito de fatores de desinfecção, aonde sugere-se que a oxidação direta pelas espécies reativas de oxigênio pode ser a principal responsável pela atividade antimicrobiana (SHIM et al., 2016).

O dióxido de titânio sólido é usado como fotocatalisador, gerando reações em cadeia que envolvem radicais ativos, ou seja, TiO_2 pode atuar como *sensibilizador* absorvendo radiação e gerando espécies reativas que destroem resíduos.

Quando a superfície do TiO_2 é irradiada com radiação UV, lacunas h são geradas em sítios onde elétrons excitados (e^-) são produzidos como demonstrado em (2). Os elétrons podem reagir com o O_2 dissolvido para gerar O_2^- reativo (3) e as lacunas superficiais podem aceitar elétrons do íon hidroxila dissolvido para produzir radicais hidroxila reativos na superfície do composto titânico (4). Estes radicais hidroxila iniciam as reações que levam à destruição de resíduos e também os sítios $\text{TiO}_2(h)$ podem reagir diretamente com as moléculas do resíduo, abstraindo elétrons delas (MANAHAN, 2013).



Alguns nanomateriais inorgânicos típicos que incluem metais (Au, Ag, etc) e óxidos metálicos (ZnO, MgO, TiO_2 , etc) são utilizados em combinação com outros materiais e tem sido frequentemente empregado na síntese de nanocompósitos poliméricos, onde atuam como materiais de reforço. Dentre os nanomateriais, as nanopartículas de dióxido de titânio (NPs- TiO_2) têm sido amplamente estudadas devido às suas propriedades estruturais, térmicas, eletrônicas e antibacterianas (KHAN et al., 2015). A maioria dos nanomateriais (metais e óxidos metálicos) apresentam forte ação antibacteriana e antifúngica. No entanto, essa ação depende

do tamanho, forma, tempo de exposição, concentração e natureza dos microrganismos envolvidos (KHAN, S.T. et al., 2015).

Devido às suas propriedades físicas e químicas únicas, como grande área superficial, as nanopartículas de dióxido de titânio são produzidas em grande escala para aplicações industriais a fim de atender as crescentes demandas do mercado (LIN et al., 2014).

4 METODOLOGIA

Para a realização deste projeto, a metodologia demonstrada no fluxograma da Figura 4 foi empregada.

Figura 4. Fluxograma representando a metodologia do projeto.



Fonte: O autor

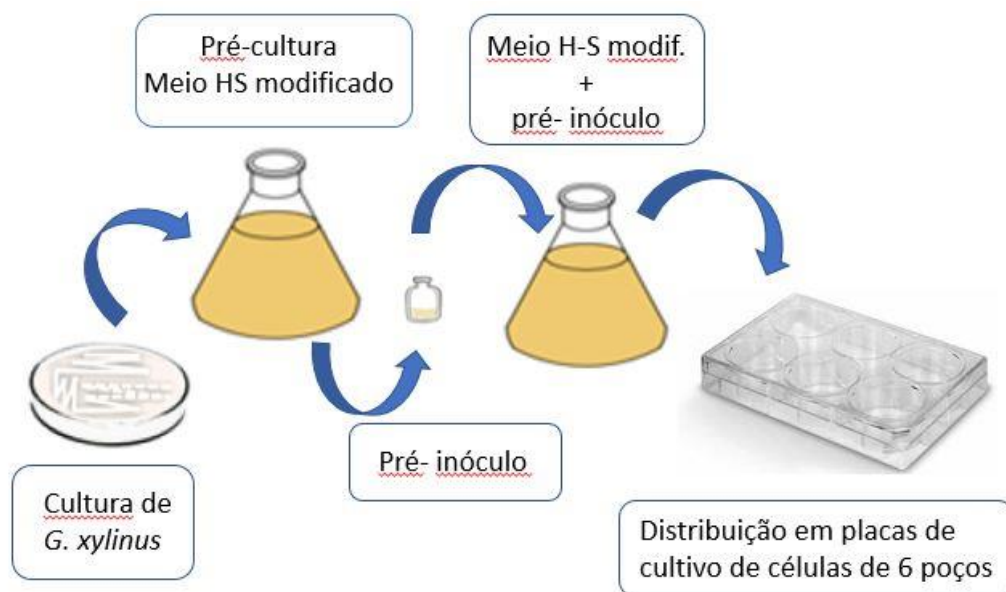
4.1 Produção de celulose bacteriana

Membranas de celulose bacteriana foram produzidas a partir da bactéria *G. xylinus*, a partir de uma cepa gentilmente cedida pelo professor Dr. José Domingos Fontana, ex-professor visitante da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O meio de cultivo empregado foi o meio HS (Hestrin-Shramm) com modificações, no qual a principal fonte de carbono, a glucose (2% p/v), é substituída pelo glicerol (2% p/v) resultando num meio com a seguinte composição: glicerol 2% (p/v), peptona 0,5 %, extrato de levedura 0,5 %, fosfato dissódico, 0,27% e ácido cítrico 0,115%, com pH ajustado para 4,0 com ácido acético 0,1 M (HESTRIN; SCHRAMM, 1954).

O inóculo foi preparado pela transferência de 0,5 mL de um pré-cultivo mantido sob condições estáticas a 28°C em meio HS, para um frasco com 10 mL de meio HS modificado. O frasco foi incubado em estufa a 28°C em condição estática por 48 h. Após esse período, o frasco foi manualmente e vigorosamente agitado para desprendimento das células bacterianas aderidas à fina membrana formada e ao mesmo frasco foram acrescentados 90 mL de meio HS modificado.

Realizou-se o cultivo em placas de cultura de células (seis poços, cada poço com diâmetro de 4,2 cm) contendo 10 mL de meio HS modificado. Entre a placa e a tampa foi adaptado um calço de fita crepe de forma que possibilitasse maior aeração do sistema, mantendo as condições estéreis. As placas foram incubadas em estufa a 28°C durante cinco dias em condição estática, conforme esquema demonstrado na Figura 5.

Figura 5. Esquema demonstrando etapas de produção de celulose bacteriana.



Fonte: O autor.

As membranas de CB foram purificadas (remoção de células, meio de cultivo) com uma solução de NaOH 0,3 M a 121°C por 15 minutos, seguida por lavagem abundante em água deionizada até neutralização do pH da água de lavagem conforme metodologia adaptada de Khan, S. e colaboradores (2015).

4.2 Incorporação de nanopartículas de TiO₂ à celulose bacteriana

O TiO₂ utilizado no estudo é comercializado pela *Evonik* (Degussa - P25) sendo composto por 70% sob forma de anatase e 30% de rutilo ou 80% anatase e 20% rutilo, com tamanho das partículas de aproximadamente 21 nm (KAMAT, 2011).

As NPs de TiO₂ foram incorporadas as membranas de CB por banho ultrassônico (marca Ya Xun, modelo 3560). Para tanto, 40,00 g de membranas circulares (massa úmida) de CB (cada com um diâmetro de 4,2 cm, espessura de 5 mm) foram imersas numa solução de 2% (m/v) de NPs- TiO₂ em banho ultrassônico a temperatura ambiente durante 60 e 90 minutos a 50W de potência. Posteriormente, as membranas de CB-TiO₂ foram removidas da solução e lavadas completamente com água deionizada para remoção completa de TiO₂ aderida na superfície das membranas. As membranas de CB-TiO₂ foram mantidas em água deionizada a 4°C para os testes posteriores (PIELAK, 2018).

4.3 Caracterização da NPs TiO₂-CB

4.3.1 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Foram analisadas celulose pura (CB) e celulose com TiO₂ agregado (CB-TiO₂) por infravermelho por transformada de Fourier em espectrofotômetro (Varian 640-IR localizado no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná) na faixa de 4000 a 650 cm⁻¹, resolução de 4cm⁻¹ e 25 varreduras conforme metodologia adaptada de Auta e colaboradores (2017) para se obter informações sobre as estruturas químicas de cada composto analisado.

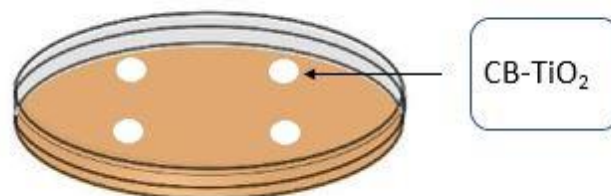
4.4 Avaliação de atividade antimicrobiana

4.4.1 Avaliação de atividade antimicrobiana com discos de CB impregnados com TiO₂ em meio sólido

Membranas de CB-TiO₂ foram secas em *gel dryer*, marca BIO-RAD, modelo 543, a 80 °C por 60 minutos a vácuo, cortadas em discos de raio igual a 0,3 cm e área de 0,283 cm², esterilizadas em autoclave a 121,0° C e 1,1 kgf por 15 minutos e armazenadas em plástico *Ziplock*.

Para essa avaliação foi utilizado o método da suspensão da colônia direto da placa conforme *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. (2006) Neste ensaio foram utilizadas duas espécies de bactérias, a *Escherichia coli* ATCC 8739 e o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Para o preparo do ensaio as células foram transferidas com auxílio de alça de platina de um cultivo em meio ágar nutriente com 24 h de crescimento a 28,0 °C para um frasco contendo 10 mL de solução salina (0,7% NaCl) até a turbidez atingir 0,5 da escala de McFarland (~ 1,5 x 10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL) por comparação visual. Após ajuste do inóculo, procedeu-se à semeadura com um swab estéril em toda a superfície das placas contendo ágar nutriente. Após absorção das células pelo meio de cultivo adicionou-se a cada quadrante da placa um pedaço circular (diâmetro igual a 0,6 cm) da membrana de CB-TiO₂ (Figura 6).

Figura 6. Demonstração de placa preparada para avaliação de atividade antimicrobiana em meio sólido.



Fonte: O autor.

As placas foram incubadas a 28,0 °C por 24 horas para posterior análise do halo de inibição conforme descrito por Khan, S. e colaboradores (2015). A avaliação foi realizada em triplicata.

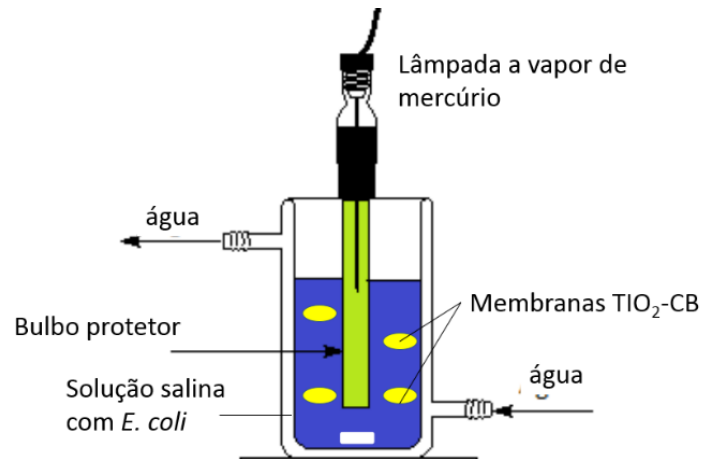
4.4.2 Avaliação de atividade antimicrobiana em meio líquido com fotoativação

Para ensaio da atividade antimicrobiana em reator fotoquímico foi utilizada a cepa de referência de *E. coli* ATCC 8739 (*American Type Culture Collection*, EUA) que a partir de uma colônia isolada em meio ágar nutriente foi repicada para 5 mL de meio de cultivo caldo nutriente. Após crescimento durante 24 h a 37 °C com auxílio de uma alça de platina a suspensão foi plaqueada pelo método de estriamento em meio ágar nutriente seguido por incubação durante 24 h a 37 °C. Com o auxílio de uma alça de platina foram transferidas colônias em 500 mL de solução salina (0,7% NaCl) até que a turbidez da suspensão correspondesse à 0,5 na escala de *McFarland* ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹).

A atividade antimicrobiana do nanocompósito frente a *E. coli* foi avaliada utilizando um reator fotoquímico convencional de bancada (220 mL de capacidade total), com 14,0 cm de altura e 6,0 cm de diâmetro interno, equipado com agitação magnética (200 rpm), refrigerado com água e disposto dentro de uma câmara escura gentilmente disponibilizados pelo Laboratório de Contaminantes Ambientais da UTFPR.

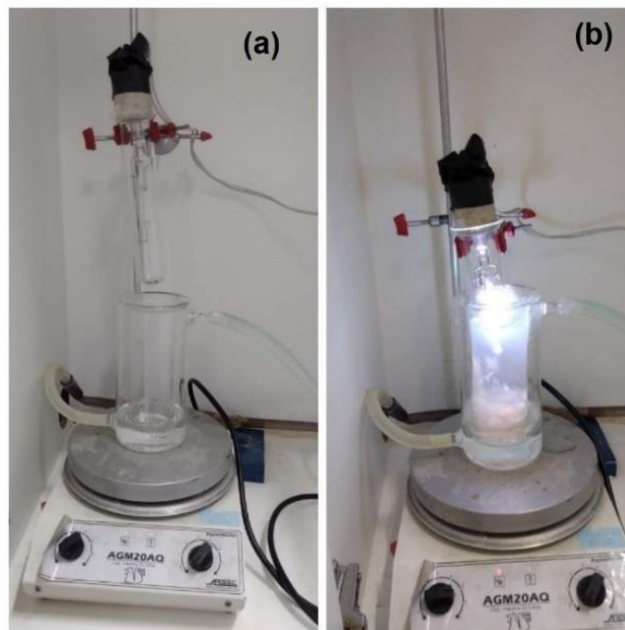
A radiação UV-A necessária para as análises foi conferida por uma lâmpada a vapor de mercúrio de 125 W (sem o bulbo protetor original), inserida na solução por meio de um bulbo de vidro *Pyrex*, como representado nas Figuras 7 e 8.

Figura 7. Sistema para a realização dos ensaios de fotocatalise.



Fonte: O Autor.

Figura 8. Análise em reator fotoquímico. (a) Montagem do aparato experimental ainda com a lâmpada apagada (b) Análise em curso em reator fotoquímico.



Fonte: O autor.

O ensaio foi realizado utilizando como base o experimento proposto por Chatzisyneon e colaboradores (2011) que estudaram a eficiência de desinfecção de *E. coli* por irradiação UV-A e UV-C na presença e ausência de TiO₂.

Para isso, 150 mL de uma suspensão de *E. coli* (~10⁵ UFC·mL⁻¹) em solução salina 0,7% foi introduzida no reator fotoquímico. Foram realizadas 7 análises conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Condições e duração de cada uma das análises de inibição do crescimento de *E. coli* realizados em duplicata (n=2).

Experimento	1	2	3	4	5	6
Composição amostra / presença de UV-A	<i>E-coli</i> *	CB-TiO ₂ / UV-A	TiO ₂ / UV-A	CB/ UV-A	CB	CB-TiO ₂
Tempo (min)	0*	15	15	15	15	15

* Retirada de alíquota da solução (*E. coli* em salina 0,7 %) no tempo t = 0 sem utilização do reator fotoquímico para controle.

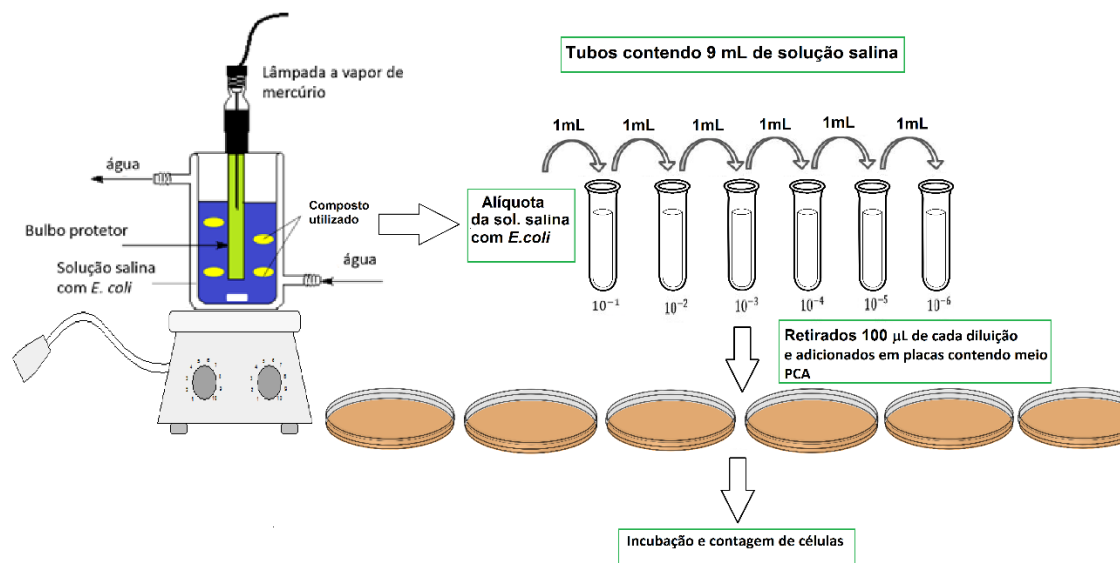
Os experimentos foram realizados com *E. coli* nas condições supracitadas durante 15 minutos. Amostras de 1,0 mL foram removidas ao fim de cada para prosseguir com plaqueamento em meio sólido. Após diluição seriada em tubos de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina, transferiu-se 100 µL de cada tubo para placas de Petri contendo meio PCA (*Plate Count Agar*). As placas foram mantidas em estufa a 37,0 °C por 24 horas e após este período realizou-se contagem dos microrganismos viáveis nas placas. O esquema da análise é demonstrado na Figura 9 e foi realizado em duplicata, totalizando 72 placas de Petri.

Para calcular as unidades formadoras de colônia por cada mL de solução salina, foi utilizada a Equação 2.

$$UFC \cdot mL^{-1} = Y \times (fator \ de \ diluição)^{-1} \times 10 \quad (2)$$

Em que Y é o número de colônias contadas em determinada placa. Necessita-se multiplicar o número de colônias pelo inverso do fator de diluição e corrigir para o volume de 1 mL, visto que a alíquota retirada de cada tubo para plaqueamento era de 100,0 μL , ou 0,1 mL.

Figura 9. Esquema demonstrando etapas das análises realizadas.



Fonte: O autor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Produção de celulose bacteriana

Foi possível produzir celulose bacteriana (CB), utilizando meio HS modificado (HESTRIN; SCHRAMM, 1954) em que glicerol substitui a glucose como fonte de carbono. Segundo Huang e colaboradores (2014), diversos compostos, além do glicerol e glucose, como frutose, sacarose, maltose, celobiose, etc, podem ser utilizados como fonte de carbono na composição do meio HS modificado. Kurosumi e colaboradores (2009) relataram a produção de celulose por *Acetobacter xylinum* NBRC 13693 usando sucos (laranja, maçã, pera, abacaxi e uva) como meio de cultura. O teor e o tipo de açúcar presente em cada suco de frutas variaram e os autores sugeriram que quantidades apreciáveis de celulose bacteriana poderiam ser produzidas a partir de sucos de frutas contendo uma abundância de sacarose e frutose.

Uma das vantagens do uso do glicerol como fonte de carbono é seu baixo custo quando comparado à glucose. O meio de cultura é o fator mais importante para o custo total de produção da CB. Portanto, um aspecto importante na sua produção é a identificação um meio de cultura de baixo custo que possa alcançar um bom rendimento da CB e ser usado como uma solução economicamente viável para aplicação em uma variedade de campos (JOZALA et al., 2016).

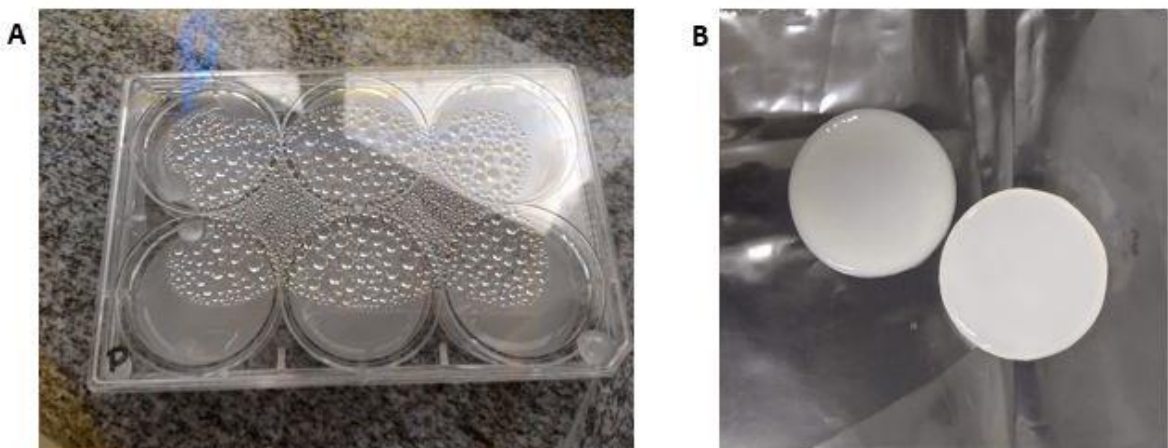
Obtém-se glicerol como coproduto a partir da transesterificação de óleos vegetais em meio ácido e este processo tem sido amplamente utilizado para a produção de biodiesel em vários países (Fukuda; Kondo; Noda; 2001; Schuchardt et al., 1998). Neste caso, a utilização de coprodutos ou resíduos pode ser vista como uma boa alternativa para a diminuição de custos, além de agregar valor ambiental pelo reaproveitamento do mesmo (MIKKELSEN et al., 2009).

Como a produção da celulose bacteriana foi realizada em meio estático, necessitou-se uma adaptação nas placas de meio de cultivo para que este fosse realizado em meio aeróbico, levantando levemente a tampa da placa, visto que a bactéria utilizada para tal finalidade, a *Gluconacetobacter xylinus*, é aeróbia restrita.

A membrana de celulose obtida apresenta a forma do recipiente em que é cultivada (KLEMM et al., 2001). Tendo isso em vista, obteve-se membranas de celulose em forma circular de 4,2 cm de diâmetro, mesmo tamanho e formato do poço, conforme pode-se observar na Figura 10. A espessura das membranas obtidas variou de acordo com o tempo de incubação, fato que foi relatado em outro trabalho (DANESI; WOSIACKI, 1998).

As membranas obtidas apresentaram um aspecto e textura gelatinosa quando úmidas.

Figura 10. Membranas de celulose bacteriana obtidas a partir de cultivo de *G. xylinus* em meio HS modificado, incubadas em condição estática a 28,0°C por 5-7 dias em (A) placas de cultivo de seis poços e (B) avulsas para experimentos posteriores.



Fonte: O autor.

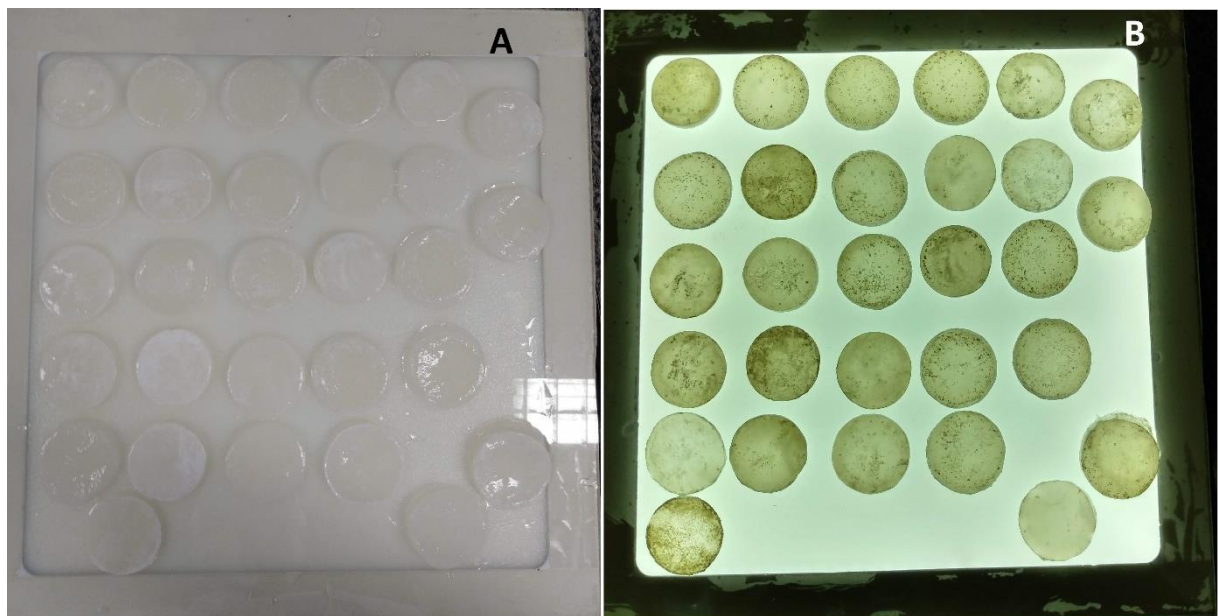
Para a purificação e lavagem das membranas de celulose obtidas utilizou-se apenas solução de NaOH 0,1 M, gerando um resíduo que pode ser facilmente neutralizado por uma reação ácido-base e descartado sem grandes danos ao ambiente, diferente do processo de purificação da celulose vegetal que necessita de vários processos químicos e reagentes oxidantes (ALMEIDA et al., 2007).

5.2 Incorporação de nanopartículas de TiO_2 à celulose bacteriana

A eficácia da incorporação de nanopartículas de dióxido de titânio à celulose bacteriana pode ser facilmente observada visualmente conforme demonstrado pela Figura 11. Os pontos brancos na Figura 11-A e os pontos em contraste na Figura 11-B são NPs- TiO_2 associadas à membrana de CB pura.

Quando secas em estufa ou em *gel dryer*, as membranas de CB- TiO_2 apresentam aspecto/textura de papel (Figura 12).

Figura 11. Celulose bacteriana com incorporação de nanopartículas de dióxido de titânio por banho ultrassônico. (A) Sem contraste com a luz e (B) em contraste com a luz.



Fonte: O autor.

Figura 12. Membranas de CB-TiO₂ secas a 80 °C por 60 minutos em gel dryer.



Fonte: O autor.

A vibração exercida pela cuba de ultrassom não interferiu na movimentação das membranas, apenas movimentando dióxido de titânio contido na solução, durante os 60 ou 90 minutos. Observou-se que não há mudança significativa na incorporação das nanopartículas na celulose com tal variação de tempo do banho ultrassônico.

5.3 Caracterização da NPs CB-TiO₂

5.3.1 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

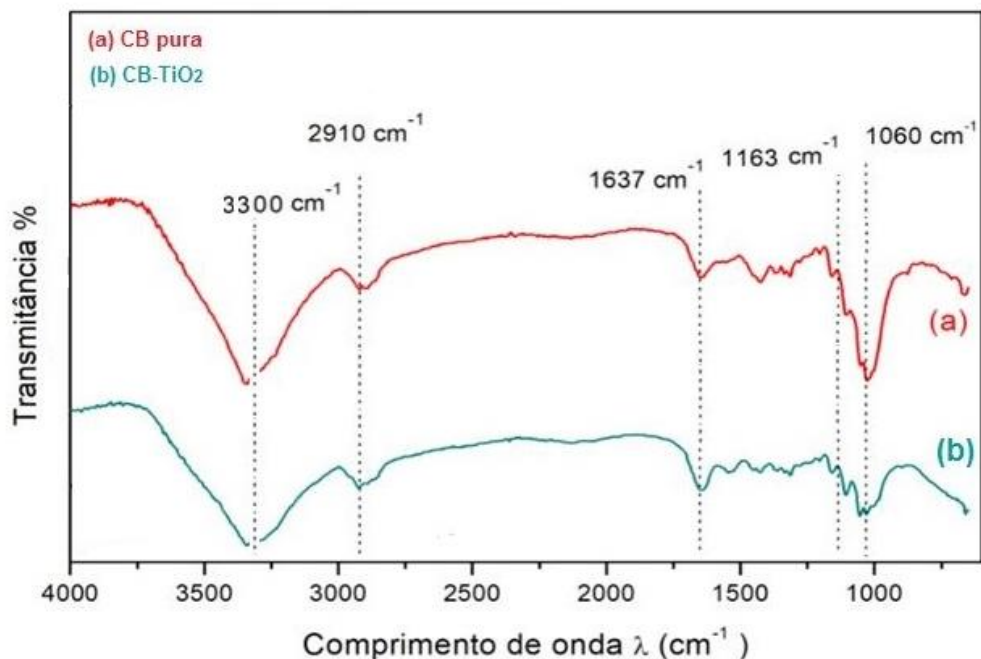
A análise de FTIR foi realizada objetivando obter informações sobre as estruturas químicas de cada composto analisado. A escolha desta análise se deu por possibilitar um espectro com uma melhor razão sinal/ruído, apresentando também considerável velocidade e sensibilidade para análises (PAVIA et al, 2010).

Analisando o espectro obtido na Figura 13 observa-se uma absorção forte em 3300 cm⁻¹, de posição e formato característico de estiramento (3700-3000 cm⁻¹) de grupo hidroxila (O-H), provenientes das ligações de hidrogênio intra e intermolecular da celulose. As bandas 1060 cm⁻¹ e em 1163 cm⁻¹, apresentaram, em

ambas as amostras, vibrações características de C-O ($1300-1100\text{ cm}^{-1}$). Entretanto, na análise de CB-TiO₂, tais bandas apresentaram menor intensidade, que pode ser atribuída às nanopartículas depositadas na superfície da celulose (PAVIA et al, 2010; QIAN; ANTONIETTI; YU, 2007). A banda de 1637 cm^{-1} representa dobramento de molécula de O-H, possivelmente proveniente de água absorvida pela celulose (AUTA et al, 2017). A banda observada em 2910 cm^{-1} é característica de estiramento de alcanos ($3000 - 2850\text{ cm}^{-1}$), ligações do tipo C-H, presentes na estrutura da celulose. (PAVIA et al, 2010).

Observando a intensidade diferente de sinal nas bandas obtidas para a celulose bacteriana pura e nas bandas obtidas para o nanocompósitos de CB-TiO₂, pode-se atribuir tal diferença à eficácia da associação das nanopartículas de dióxido de titânio à superfície da membrana de celulose.

Figura 13. Comparação da celulose pura (CB) com o nanocompósito CB-TiO₂ testados através de análise por FTIR.

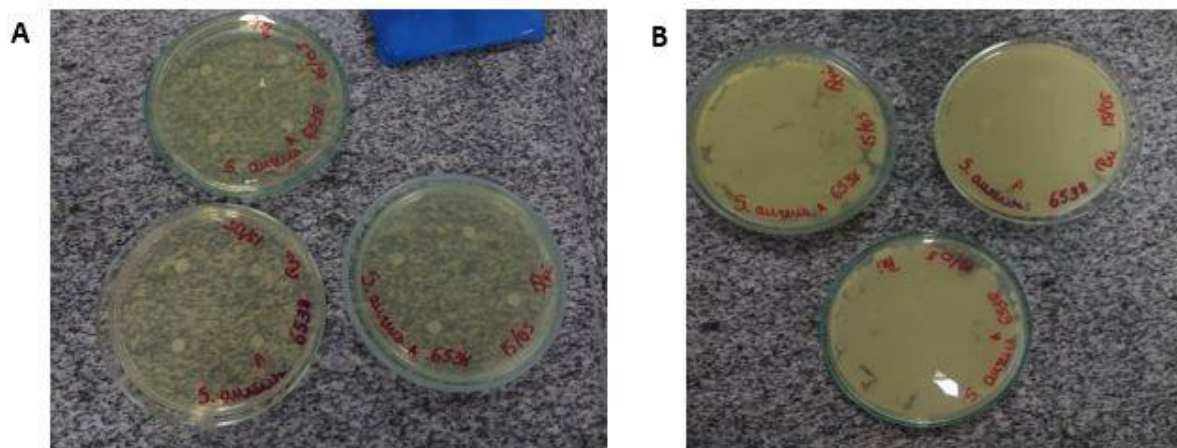


5.4 Avaliação de atividade antimicrobiana

5.4.1 Avaliação de atividade antimicrobiana com discos de CB impregnados com TiO₂ em meio sólido

Este teste baseia-se na difusão do gradiente antimicrobiano no ágar para a determinação da sensibilidade da amostra bacteriana ao antimicrobiano testado. Após o tempo de incubação em estufa, meio estático, por 24 horas, as placas foram analisadas para observação de possível existência de halo de inibição devido ao contato com a celulose bacteriana associada a TiO₂ a 2%. Entretanto, observou-se, em todas elas, o crescimento sobre toda a superfície tanto da *E. coli* ATCC 8739 quanto do *S. aureus* ATCC 6538, sem indício de inibição de crescimento microbiano. Na Figura 15 pode-se observar o resultado obtido para a *S. aureus*.

Figura 14. Placas preparadas para avaliação de atividade antimicrobiana perante *S. aureus* ATCC 6538 em meio sólido contendo ágar nutriente, com discos circulares de CB-TiO₂ antes (A) e depois de 24 horas de incubação à 28,0°C (B).



Fonte: O autor.

O teste de difusão em ágar, também conhecido de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é submetido a interagir contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo utilizado com a concentração da

substância ensaiada (Pinto et al., 2003). Entretanto, esta técnica baseia-se na capacidade da substância biologicamente ativa em migrar para o meio de cultivo utilizado, o que não acontece com o TiO_2 e a CB, visto que uma das vantagens de sua utilização é o pequeno desprendimento das NPs de TiO_2 da membrana de CB (PIELAK, 2018).

S. Khan e colaboradores (2015) testaram a atividade antimicrobiana de CB- TiO_2 frente *E. coli*, sem fotoativação observando inibição do crescimento do microrganismo. Entretanto, a metodologia utilizada por eles foi realizada em meio líquido, em que as membranas de CB- TiO_2 foram finamente fatiadas, esterilizadas e adicionadas em tubos de ensaio contendo meio de cultivo *E. coli*. Após o tempo de incubação de 24 horas a 37°C , cada amostra foi espalhada em placas contendo meio ágar. Após a incubação, foi realizada a contagem de microrganismos em cada placa.

Esperava-se, mesmo sem a utilização da radiação UV-A, observar algum indício de inibição de crescimento microbiano. Possíveis explicações seriam a quantidade inexpressiva de TiO_2 contida em apenas 4 discos de CB- TiO_2 com 0,6 cm de diâmetro ou mesmo o tipo de TiO_2 utilizado e que a técnica de difusão não é eficiente para tal composto.

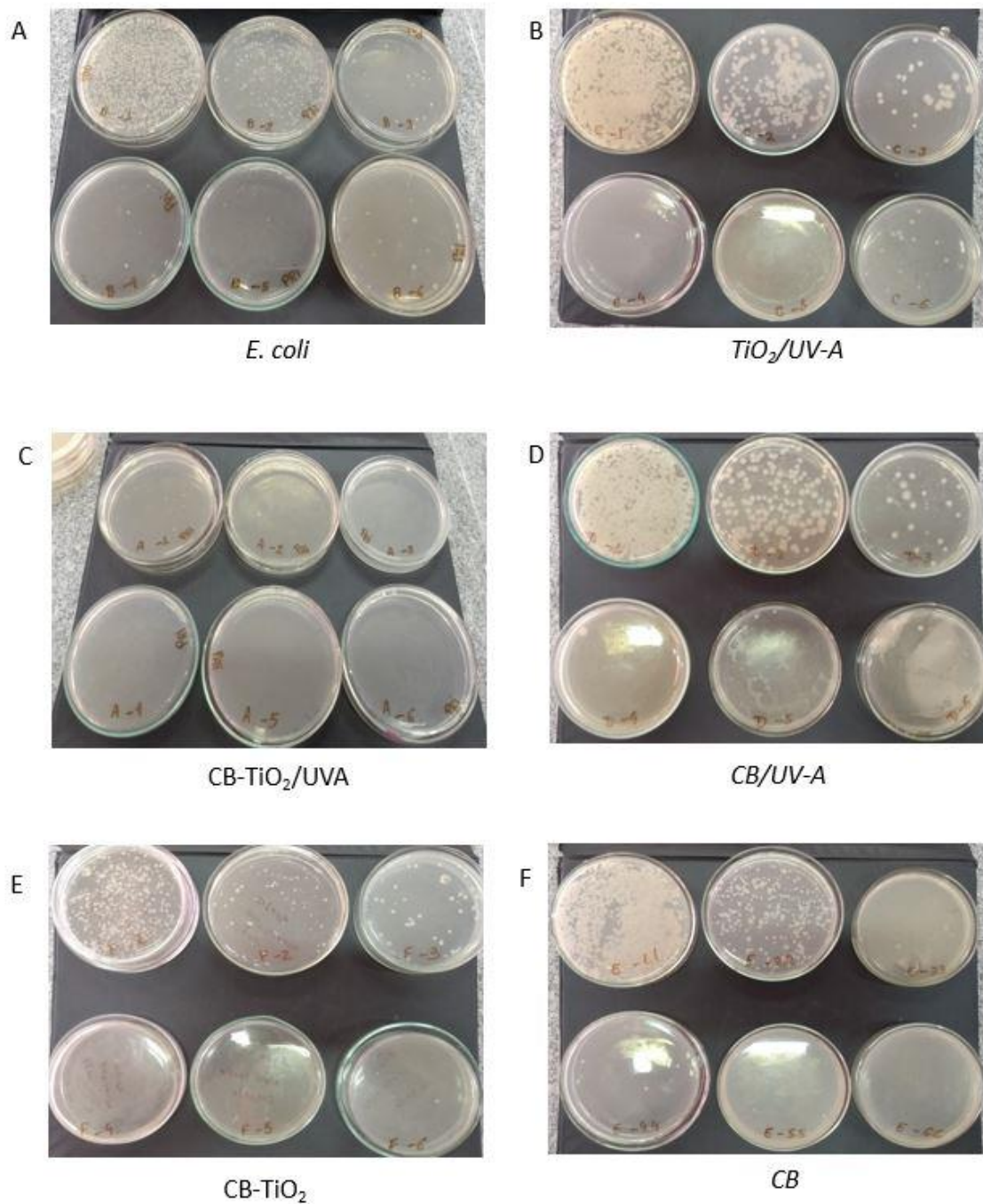
5.4.2 Avaliação de atividade antimicrobiana em meio líquido com fotoativação

Para ensaio da atividade antimicrobiana de CB em reator fotoquímico foi utilizada somente a cepa de referência de *E. coli* ATCC 8739 presente em solução salina em concentração apropriada. Seguido o tratamento com ou sem UV-A foi verificado a viabilidade da bactéria através do método de diluição seriada e plaqueamento. Em paralelo, como controles do ensaio foram feitos experimentos com: 1) somente CB, sem UV-A; 2) somente CB, com UV-A; 3) somente TiO_2 com UV-A; 4) *E. coli* sem tratamento;

Após realização das análises em reator fotoquímico convencional de bancada, com 150 mL de solução salina contendo *E. coli*, sob agitação magnética na presença (por 15 minutos) e na ausência de radiação UV-A, conforme demonstrado na Figura 9 (item 5.4.2), realizou-se a contagem de células presentes após diluição seriada e plaqueamento e incubação por 24 horas a $37,0^\circ\text{C}$ em estufa (Figura 15).

A análise utilizando apenas *E. coli* foi realizada visando um controle negativo da atividade antimicrobiana, ou seja, um ensaio realizado em condições favoráveis ao crescimento do microrganismo para posterior comparação com os demais testes (branco). A Figura 15-A representa o crescimento de colônias de *E. coli* sem nenhum tratamento prévio (por radiação ou por contato com material bactericida).

Figura 15. Placas utilizadas após cada tratamento para contagem de microrganismos viáveis.



Fonte: O autor.

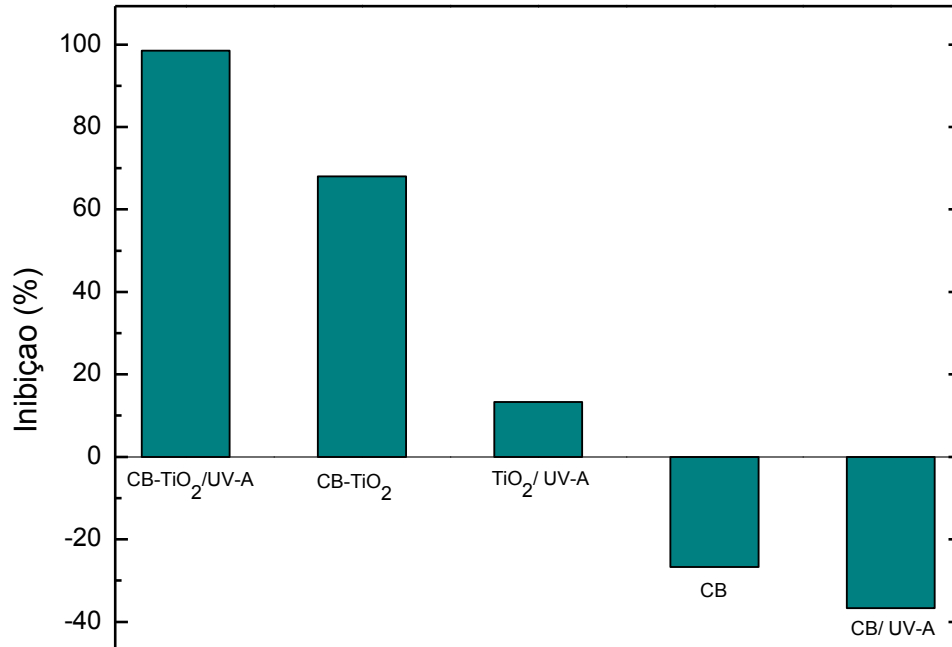
Os valores de unidades formadoras de colônia por volume de amostra calculados para cada análise realizada encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Dados de UFC·mL⁻¹ para cada análise realizada.

Análise	UFC·mL ⁻¹
CB	$(3,8 \pm 0,3) \times 10^5$
CB/ UV-A	$(4,1 \pm 1,0) \times 10^5$
TiO₂/ UV-A	$(2,6 \pm 0,2) \times 10^5$
E. coli	$(3,0 \pm 0,2) \times 10^5$
CB-TiO₂	$(9,6 \pm 0,1) \times 10^4$
CB-TiO₂/ UV-A	$(4,58 \pm 1,2) \times 10^3$

Construiu-o gráfico da Figura 16 para melhor comparação e visualização dos resultados obtidos.

Figura 16. Gráfico correlacionando cada um dos tratamentos com o crescimento observado em UFC·mL⁻¹.



Fonte: O autor.

Diante dos resultados observados pode-se afirmar que a celulose bacteriana pura, mesmo em contato com a radiação UV-A, não produz qualquer efeito bactericida ou bacteriostático, uma vez que o crescimento celular observado nas placas após as análises (CB e CB-UV-A) foi semelhante ao observado nas placas em que havia apenas o microrganismo modelo sem nenhum tipo de tratamento. Tal comportamento está de acordo com os resultados obtidos em outro trabalho (Khan, S., et al, 2015).

Observa-se 13,33% de inibição do crescimento microbiano após tratamento com as nanopartículas de dióxido de titânio e radiação UV-A quando comparado ao branco (apenas *E. coli* em meio de cultivo sem tratamento prévio). O TiO₂ já foi relatado como tendo fortes efeitos antibacterianos, tanto isoladamente quanto associado a vários materiais compostos. De acordo com Garusinghe e

colaboradores (2018), a fotocatalise é um fenômeno de superfície, em que apenas as NPs retidas na superfície externa de um dado compósito, que são irradiadas com a radiação UV participam do processo de fotocatalise. Quando associadas à celulose bacteriana e irradiadas com UV-A, as NPs-TiO₂ demonstram inibição do crescimento microbiano. Tal comportamento corrobora com os resultados obtidos por Chatzisyneon e colaboradores (2011). Isto implica que as bactérias *E. coli* interagiram com a superfície da CB-TiO₂ resultando na perda de viabilidade bacteriana e aponta para um efeito sinérgico entre a radiação utilizada 315 – 400 nm, UV-A, e as espécies oxidativas geradas pela fotoativação do TiO₂.

Um mecanismo plausível de ação antibacteriana das NPs-TiO₂ e, conseqüentemente da CB-TiO₂ poderia ser a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) resultantes da fotocatalise do TiO₂. Assim, o estresse oxidativo é a chave para o mecanismo antibacteriano. Tal estresse pode ser causado por diversos fatores, incluindo a geração de ROS como H₂O₂, O₂⁻, OH[•], através de múltiplos possíveis mecanismos. A geração excessiva de ROS induz a permeabilidade da membrana mitocondrial e danifica a cadeia respiratória celular, além de levar à geração de radicais livres, seja por interação com componentes celulares ou pela ativação da enzima NADPH-oxidase (KHAN, S., et al, 2015; KHAN, S.T., et al, 2015).

A fotoativação da CB-TiO₂ aumentou notavelmente a atividade antimicrobiana do composto frente à *E. coli* (ATCC 8739), apresentando inibição de 98,5% quando comparado ao branco. De acordo com Maness e colaboradores (1999), a fotoativação das nanopartículas de TiO₂ aumenta consideravelmente a atividade antimicrobiana frente à *Bacteroides fragilis*, *E. coli*, *E. contracto*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* e *S. aureus*. Em suas pesquisas, Baram e colaboradores (2011) afirmam que a utilização de NPs-TiO₂ inativa eficientemente *E. coli*, *P. fluorescens* e *D. radiodurans*, após 10-15 min de radiação. Entretanto, para a bactéria *S. natans* mostra-se estável durante a fotocatalise, mesmo após 3 horas de irradiação. Este resultado pode ser explicado pela bainha tubular, protegendo as bactérias e isolando a membrana das bactérias de reagir com os radicais.

S. Khan e colaboradores (2015) demonstraram em um de seus trabalhos que há um maior efeito bactericida/bacteriostático quando utiliza-se NPs de TiO₂ puras em comparação a CB-TiO₂ e que as atividades bactericidas muito fortes das NPs de TiO₂ na forma livre e composta podem ser atribuídas ao seu pequeno tamanho.

Comparando os resultados obtidos frente *E. coli* utilizando CB-TiO₂ (inibição de 68,0%), CB-TiO₂/UV-A (inibição de 98,5%) e TiO₂/UV-A (inibição de 13,33%), esperava-se que o último apresentasse maior inibição, seguido do CB-TiO₂/UV-A e pelo CB-TiO₂. Entretanto, os resultados obtidos indicam que a quantidade de TiO₂ utilizada na sua forma livre não foi o suficiente para exercer considerável inibição de crescimento microbiológico, sendo interessante, assim, uma posterior análise com maiores concentrações das NPs de TiO₂.

Wei e colaboradores (1994) analisaram a destruição completa de 10⁸ UFC·mL⁻¹ de *E. coli* após submetê-la a uma suspensão de nanopartículas de TiO₂ sob radiação solar. Foi relatado a viabilidade celular diminuiu notoriamente com um aumento na concentração de TiO₂ empregada e que a eficiência fotocatalítica depende, inclusive, da intensidade da radiação utilizada.

Constata-se, assim, eficiência da atividade antimicrobiana do composto (CB-TiO₂) frente à *E. coli* na presença de radiação UV-A, apresentando inibição de 98,5%.

6 CONCLUSÃO

Produziu-se celulose cultivando *Gluconacetobacter xylinus* em meio de cultivo HS modificado, utilizando glicerol ao invés de glucose como fonte de carbono. Com tal substituição é possível reduzir custo, sendo tal substituição economicamente viável, alcançando um bom rendimento de CB, além agregar valor ambiental pelo reaproveitamento do glicerol, obtido, dentre outras maneiras, como coproduto na produção de biodiesel.

Utilizou-se banho ultrassônico como ferramenta para incorporação de nanopartículas de dióxido de titânio à celulose bacteriana e a confirmação da mesma foi confirmada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), em que se pode, através do espectro obtido, comparar a CB pura com a CB-TiO₂.

Avaliou-se a atividade antimicrobiana, em meio sólido colocando-se discos de CB-TiO₂ em contato com microrganismo em meio sólido sem fotoativação e em meio líquido com fotoativação. O contato direto de CB-TiO₂ não demonstrou qualquer indício de inibição de crescimento microbiano frente à *E. coli* ATCC 8739 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

As análises realizadas em meio líquido, utilizando *E. coli* ATCC 8739 como organismo modelo, com radiação UV-A apresentaram resultados promissores no que diz respeito à inibição de crescimento microbiano. Realizou-se testes com celulose bacteriana pura, com nanopartículas de TiO₂ puras e do composto de interesse, CB-TiO₂, todos na presença e na ausência de radiação UV-A. Entretanto, os resultados obtidos com TiO₂ puro (inibição de 13,33%) indicam que a quantidade de TiO₂ utilizada na sua forma livre não foi o suficiente para exercer a inibição esperada de crescimento microbiológico (esperava-se que nestas condições a inibição fosse a maior de todas), sendo interessante, assim, utilizar concentrações maiores das NPs de TiO₂.

Foi constatada a eficiência da inibição de crescimento microbiano da CB-TiO₂ quando submetida à radiação (inibição de 98,5%) e também na ausência dela (inibição de 68,0%), sendo os resultados obtidos com UV-A superiores aos resultados sem a radiação devido à necessidade da radiação para a fotocatalise do TiO₂

agregado, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS). O estresse oxidativo causado pelas ROS é a chave para o mecanismo antibacteriano.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros podem ser considerados a otimização da incorporação das nanopartículas de dióxido de titânio à membrana de celulose bacteriana, quantificando a concentração necessária para a inibição do crescimento microbiano por área de material utilizado, bem como também a associação da celulose com outros materiais, juntamente com o TiO_2 visando a formação de filmes com atividade antimicrobiana, podendo ser utilizados para o revestimento de superfícies e equipamentos diversos.

Além disso, utilizar outros métodos de caracterização para testar a atividade antimicrobiana frente a outros microrganismos modelo.

REFERÊNCIAS

- ANTONIO, Regina Vasconsellos; SOUZA, Derce Oliveira; NAZARIO, Ana Carla; TIMBONI, Diego; FERRANINI, Eduarda; RODOWANSKI, Giovana Pascoali; CAUDURO, Maria Tereza; Peres, Samira da Silva. Produção de celulose bacteriana a partir de diversos substratos. **Rev. Técnico Científica**, v. 3, n.1, 2012.
- ALMEIDA, H.C.; SILVEIRA, C.B.; ERNANI, P.R.; CAMPOS, M.L.; ALMEIDA, D. Composição química de um resíduo alcalino da indústria de papel e celulose (dregs). **Quim. Nova**, V. 30, N. 7, p. 1669-1672, 2007.
- AUTA, R. et al. Production and characterization of bacterial cellulose before and after enzymatic hydrolysis. **African Journal of Biotechnology**. V.16, p. 470-482, março, 2017.
- BARAM, N.; STAROSVETSKY, D.; STAROSVETSKY, J.; EPSHTEIN, M.; ARMON, R.; EIN-ELI, Y. Photocatalytic inactivation of microorganisms using nanotubular TiO₂. **Applied Catalysis B: Environmental**. v. 101, p. 212-219, 2011.
- BETAEQ, Representação de monômero e polímero, 2018, 1 figura.
- BORGES, Shalimar S.; XAVIER, Leandro P. S.; Silva, Adilson C.; AQUINO, Sérgio F.; Imobilização de dióxido de titânio em diferentes materiais suporte para o emprego em fotocatalise heterogênea. **Química Nova**, v. 39, n. 7, p. 836-844, 2016.
- BRITO, G.F; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E.M; MÉLO, T.J.A. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6.2, p. 127-139, 2011.
- CANEVAROLO Jr, Sebastião V. **Ciência dos Polímeros: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 2 ed. São Paulo: Artliber Editora, 2002.
- CAREY, Francis A. **Química Orgânica**. 7. ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2011. vol. 2
- CHÁVEZ-PACHECO, Juan Luis; MARTÍNEZ-YEE, Suri; CONTRERAS-ZENTELLA, Martha; ESCAMILLA-MARVÁN, Edgardo. Celulosa bacteriana en gluconacetobacter xylinum: biosíntesis y aplicaciones. **Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**. v.7, p. 18-25, 2004
- CHATZISYMEON, Efthalia; DROUMPALI, Ariadni; MANTZAVINOS, Dionissios; VENIERI, Danae. Disinfection of water and wastewater by UV-A and UV-C irradiation: application of real-time PCR method. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, p. 389-395, 2011.

DANESI, Eliane Dalva Godoy; WOSIACKI, Gilvan. Otimização da produção de nata (celulose bacteriana) por fermentação em superfície. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v. 18, n. 1, p. 131–139, jan. 1998.

DONINI, Ígor A. N. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclet. Quím.**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 165-178, 2010.

FISCHER, Michele Roberta, GARCIA, Michele Cristina Formolo; NOGUEIRA, André Lourenço; PORTO, Luismar Marques; SCHNEIDER, Andréa Lima dos Santos; PEZZIN, Ana Paula Testa. Biossíntese e caracterização de nanocelulose bacteriana para engenharia de tecidos. **Revista Matéria**, 2017.

FUKUDA, H.; KONDO, A.K.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p. 405-416, 2001.

GARUSINGHE, U.M.; RAGHUWANSHI, V.S.; BATCHELOR, W.; GARNIER, G. Water Resistant Cellulose – Titanium Dioxide Composites for Photocatalysis. **Scientific Reports**, v.8, n. 2306, 2018.

GAUTO, Marcelo; ROSA, Gilber. **Química Industrial**. Porto Alegre: Bookman, 2013.

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

HUANG, Yang; ZHU, Chunlin; YANG, Jiazhi; NIE, Ying; CHEN, Chuntao; SUN, Dongping. Recent advances in bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 21, p. 1-30, 2014.

JOZALA, A. F. et al. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2063–2072, 2016.

KAMAT, P. V. Dominance of Metal Oxides in the Era of Nanotechnology. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 2, n. 7, p. 839–840, 7 abr. 2011.

KHALID, Ayesha; KHAN, Romana; UI-ISLAM, Mazhar; KHAN, Taous; WAHID, Fazli. Bacterial cellulose-zinc oxide nanocomposites as a novel dressing system for burn wounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 214-221, 2017.

KHAN, Shaukat; UI-ISLAM, Mazhar; KHATTAK, Waleed Ahmad; ULLAH, Muhammad Wajid; PARK, Joong Kon. Bacterial cellulose-titanium dioxide nanocomposites: nanostructural characteristics, antibacterial mechanism, and biocompatibility. **Cellulose**, v.22, p. 565-579, 2015.

KHAN, Shams Tabrez; AL-KHEDHAIRY, Abdulaziz A.; MUSARRAT, Javed. ZnO and TiO₂ nanoparticles as novel antimicrobial agents for oral hygiene: a review. **J Nanopart Res**, v. 17, n. 276, 2015.

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

Kurosumi, A; Sasaki, C; Yamashita, Y; Nakamura, Y. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. **Carbohydr Polym** 76: 333–335, 2009.

LI, Zhi; ZHUANG, Xu Pin; LIU, Xiao Fei; GUAN, Yun Lin; YAO, Kang De. Study on antibacterial O-carboxymethylated chitosan/cellulose blend film from LiCl/N,N-dimethylacetamide solution. **Polymer**, v. 43, p. 1541-1547, 2002.

LIN, Xiuchun; LI, Jingyi; MA, Si; LIU, Gesheng; YANG, Kun; TONG, Meiping; LIN, Daohui. Toxicity of TiO₂ Nanoparticles to *Escherichia coli*: Effects of Particle Size, Crystal Phase and Water Chemistry. **PLoS ONE**, v.9, 2014.

MADIGAN, Michel T.; MARTINKO, John M.; DUNLAP, Paul V.; CLARK, David P. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010.

MANAHAN, Stanley E., **Química ambiental**, 9 ed. Porto Alegre: Bookman, 2013.

MANEERUNG, Thawatchai; TOKURA, Seiichi; RUJIVARANIT, Ratana. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 43-51, 2008.

MANESS, P.C.; SMOLINSKI, S.; BLAKE, D.M.; HUANG, Z.; WOLFRUM, E.J. Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65, n. 9, p. 4094-4098, 1999.

MIKKELSEN, D. et al. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 576–583, ago. 2009

PAULO, Heloisa Delgado. Biopolímeros: Uma alternativa favorável. **Revista Temas Atuais em Biologia**, v.2, 2014.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à espectroscopia**. 4 ed. Cengage. Learning, 2010.

Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighteenth informational supplement. CLSI document M100-S18. Pennsylvania; 2006.

PIELAK, F. **Desenvolvimento de nanocompósitos de nanocelulose bacteriana e TiO₂ e sua aplicação na degradação do corante preto reativo 5 por fotocatalise heterogênea**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Departamento de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba. p. 92, 2018.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p., 2003.

QIAN, H.S.; ANTONIETTI, M.; YU, S.H. Hybrid “Golden Fleece”: Synthesis and Catalytic Performance of Uniform Carbon Nanofibers and Silica Nanotubes Embedded with a High Population of Noble-Metal Nanoparticles. **Advanced Functional Materials**, v. 17, n. 4, p. 637–643, 2007.

SALEIRO, G.T.; CARDOSO, S.L.; TOLEDO, R.; HOLANDA, J.N.F.; Avaliação das fases cristalinas de dióxido de titânio suportado em cerâmica vermelha. **Cerâmica**, v. 56, P. 162-167, 2010.

SANTOS, André V.P.; YOSHITO, Walter K.; LAZAR, Dolores R.R.; USSUI, Valter. **Síntese e caracterização de dióxido de titânio preparado por precipitação e tratamento hidrotérmico**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CERÂMICA, 56., 2012, Curitiba.

SANTOS, L. M. DOS. **Síntese e caracterização de TiO₂ com modificações superficiais para aplicação em fotocatalise heterogênea**. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, p. 136, 2017.

SHIM, Jaehong; SEO, Young-Seok; OH, Byung-Taek; CHO, Min. Microbial inactivation kinetics and mechanisms of carbon-doped TiO₂(C-TiO₂) under visible light. **Journal of Hazardous Materials**, v. 306, p. 133-139, 2016.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R.M. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 9, No. 1, p. 199-210, 1998.

VALERO-VALDIVIESO, Manuel Fernando; ORTEGÓN, Yamileth; USCATEGUI, Yomaira. Biopolímeros: Avances y perspectivas. **Dyna**, v.181, p. 171-180, 2013.

WEI, C; LIN, Z; WILLIAMS, N.E; ZHU, K; KRUZIC, A.P; SMITH, R.L; RAJESHWAR, K. Bactericidal Activity of TiO₂ Photocatalyst in Aqueous Media: Toward a Solar-Assisted Water Disinfection System **Environ. Sci. Technol.** v. 28, p. 934-938, 1994.