



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

VICTOR TEIXEIRA NORONHA

NANOCRISTAIS DE CELULOSE: PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E
APLICAÇÃO EM REVESTIMENTOS ANTI-INCRUSTAÇÃO BIOLÓGICA

FORTALEZA

2022

VICTOR TEIXEIRA NORONHA

NANOCRISTAIS DE CELULOSE: PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E
APLICAÇÃO EM REVESTIMENTOS ANTI-INCRUSTAÇÃO BIOLÓGICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula.
Coorientadora: Prof. Dr. Andreia Fonseca de Faria.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N769n Noronha, Victor Teixeira.
Nanocristais de celulose: propriedades antimicrobianas e aplicação em revestimentos anti-incrustação biológica / Victor Teixeira Noronha. – 2022.
120 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula.
Coorientação: Profa. Dra. Andreia Fonseca de Faria.
1. Nanocristais de celulose. 2. Materiais antimicrobianos. 3. Controle de incrustação biológica. 4. Recobrimentos antimicrobianos. 5. Nanopartículas de prata. I. Título.

CDD 660.6

VICTOR TEIXEIRA NORONHA

NANOCRISTAIS DE CELULOSE: PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E
APLICAÇÃO EM REVESTIMENTOS ANTI-INCRUSTAÇÃO BIOLÓGICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 29/08/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Antônio Gomes de Souza Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Odair Pastor Ferreira
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Profa. Dra. Anupama Ghosh
Pontífice Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)

Prof. Dr. Rafael Melo Freire
Instituto de Investigaciones Agropecuárias - Chile (INIA)

Profa. Dra. Andreia Fonseca de Faria
Universidade da Flórida - EUA (UF)

À minha Tia Ilnar (*in memoriam*) por todo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Aos Prof. Amauri e Profa. Andreia, pela oportunidade de aprendizado, amizade e orientação científica durante esta etapa.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Odair Pastor Ferreira e Prof. Antônio Gomes de Souza Filho, Profa. Anupama Ghosh e Prof. Rafael Melo Freire pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

À Dra. Camilla Camargos e à Profa. Camila Rezende do Departamento de Química da Unicamp e à Jennifer Jackson da Universidade da Flórida pela fundamental colaboração na elaboração deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais pela oportunidade de aprendizado.

Aos colegas de laboratório (Camila, Laís Helena, Laís Fregolente, Janaína, Cecília, Naiara, Marcella) pela amizade, convívio, colaboração e oportunidade de troca de conhecimentos.

À Central Analítica da UFC pela disponibilização de equipamentos para realização das análises e à equipe que a compõe pelo auxílio e ensinamentos.

Ao Departamento de Física da UFC e aos Prof. Amauri Jardim de Paula, Prof. Odair Pastor Ferreira e Prof. Antônio Gomes de Souza Filho pela estrutura para pesquisa disponível nos laboratórios.

Aos meus pais, Raimunda e Sílvio, meu irmão, Rodrigo, e minha namorada, Beatriz, pelo apoio incondicional durante essa etapa.

À Funcap, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche modalidade CAPES-PrInt (Código de Financiamento 001).

À Universidade Federal do Ceará e a todos os servidores e corpo docente que contribuíram para minha formação.

RESUMO

Nanocristais de celulose (CNCs) despontam como um nanomaterial sustentável com diferentes perspectivas de aplicações, incluindo sua utilização no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Embora alguns estudos já tenham discutido sobre a atividade antibacteriana dos CNCs, seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente compreendido. Dessa forma, o presente trabalho buscou realizar um estudo sistemático da capacidade antimicrobiana desse nanomaterial, avaliando estas propriedades sob perspectivas biológicas e físico-químicas. Inicialmente, foi efetuada a avaliação da capacidade antimicrobiana dos CNCs em sua forma dispersa em água e como recobrimento de superfícies. A toxicidade dos CNCs em suspensão contra *Escherichia coli* se mostrou dependente da concentração, apresentando um valor de concentração inibitória (IC₅₀) próximo a 200 µg/mL. As superfícies recobertas pelos CNCs foram capazes de inativar 90% das células de *E. coli* aderidas, mostrando seu potencial para aplicação como agente anti-incrustação biológica. Ensaio adicionais avaliando a capacidade oxidativa dos CNCs, sua habilidade em romper vesículas lipídicas e a morfologia de bactérias expostas ao nanomaterial evidenciaram o estresse mediado por contato como provável mecanismo de toxicidade. Posteriormente, os CNCs foram conjugados à superfície de membranas compósitas de filme fino (TFC) e suas propriedades físico-químicas, atividade antibacteriana e performance em sistema de filtração de bancada foram avaliadas. Análises de microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier mostraram a presença dos CNCs quimicamente ligados à superfície da membrana. As membranas funcionalizadas com CNCs apresentaram robusta atividade antibacteriana, inativando cerca de 89% das células de *E. coli* aderidas, sem apresentar impactos negativos nas propriedades de transporte, nem no desempenho de filtração da membrana. Por fim, buscou-se otimizar as propriedades antimicrobianas dos CNCs através da combinação do nanomaterial com nanopartículas de prata (AgNPs). Análises de espectroscopia e microscopia demonstraram o sucesso na obtenção do material híbrido (CNC/Ag) combinando as duas nanoestruturas. Recobrimentos à base de CNC/Ag foram obtidos e sua atividade antimicrobiana foi avaliada para *E. coli* e *Bacillus subtilis*. Os recobrimentos apresentaram taxas de inativação de bactérias aderidas superiores a 99%, demonstrando também atividade antimicrobiana contra bactérias em forma planctônica, com concentrações inibitórias mínimas de 25 e 100 µg/mL para *B. subtilis* e *E. coli*, respectivamente. Ensaio complementares também avaliaram os mecanismos de toxicidade do nanomaterial híbrido nas bactérias. Os resultados suscitaram

uma estratégia de “ataque-ataque” promovida pelo nanomaterial híbrido: enquanto os CNCs danificam bactérias através de perfuração por contato direto, os íons Ag^+ oriundos das AgNPs adentram nas células, interagindo com grupos contendo enxofre e nitrogênio presente em biomoléculas e organelas, resultando na interrupção de processos vitais para manutenção das células. Dessa forma, o presente trabalho permitiu uma abrangente avaliação da interação entre os nanocristais de celulose e bactérias, possibilitando o estabelecimento de possíveis mecanismos de toxicidade, bem como mostrando sua aplicabilidade em sistemas de filtração e apresentando alternativas para o aprimoramento de sua capacidade antimicrobiana.

Palavras-chave: nanocristais de celulose; materiais antimicrobianos; controle de incrustação biológica, recobrimentos antimicrobianos, nanopartículas de prata.

ABSTRACT

Cellulose nanocrystals (CNCs) arise as a sustainable nanomaterial with different application perspectives, including their use in the development of new antimicrobial agents. Although some studies have already discussed the antibacterial activity of CNCs, their mechanism of action is still not fully understood. In this sense, the present work aimed to provide a systematic study of their antimicrobial capacity, evaluating their properties under biological and physicochemical perspectives. Initially, CNCs antimicrobial ability in their water-dispersed form and as a surface coating were evaluated. The toxicity of CNCs in suspension against *Escherichia coli* was concentration-dependent, with an inhibitory concentration value (IC_{50}) close to 200 $\mu\text{g/mL}$. CNCs-coated surfaces were able to inactivate 90% of the adhered *E. coli* cells, showing its potential for application as an anti-biofouling agent. Additional assays evaluating the oxidative capacity of CNCs, their ability to disrupt lipid vesicles and the morphology of bacteria exposed to the nanomaterial highlighted contact-mediated stress as a probable mechanism of toxicity. After, CNCs were bonded to the surface of thin film composite membranes (TFC) and their physicochemical properties, antibacterial activity and performance in a benchtop filtration system were evaluated. Scanning electron microscopy, atomic force microscopy and Fourier transform infrared spectroscopy analyzes have shown the presence of CNCs chemically bonded to the membrane surface. CNCs-functionalized membranes presented robust antibacterial activity, inactivating about 89% of adhered *E. coli* cells, without presenting negative impacts on transport properties or membrane filtration performance. Finally, the optimization of the antimicrobial properties of CNCs by combining the nanomaterial with silver nanoparticles (AgNPs) was sought. Spectroscopy and microscopy analysis demonstrated the success in obtaining a hybrid material (CNC/Ag) combining the two nanostructures. CNC/Ag-based coatings were obtained and their antimicrobial activity was evaluated for *E. coli* and *Bacillus subtilis*. The coatings showed inactivation rates of adherent bacteria above 99%, presenting also antimicrobial activity against bacteria in planktonic form, with minimum inhibitory concentrations of 25 and 100 $\mu\text{g/mL}$ for *B. subtilis* and *E. coli*, respectively. Complementary assays also evaluated the toxicity mechanisms of the hybrid nanomaterial against bacteria. The results raised an “attack-attack” strategy promoted by the hybrid nanomaterial: while CNCs damage bacteria through direct contact drilling, Ag^+ ions from AgNPs enter cells, interacting with groups containing sulfur and nitrogen present in biomolecules and organelles, resulting in the interruption of vital processes for cell maintenance. Thus, the present work allowed a comprehensive

evaluation of the interaction between cellulose nanocrystals and bacteria, allowing the establishment of plausible toxicity mechanisms, as well as showing its applicability in filtration systems, and presenting alternatives for the improvement of its antimicrobial capacity.

Keywords: cellulose nanocrystals; antimicrobial materials; biofouling control, antimicrobial coatings, silver nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química da celulose.....	19
Figura 2 -	Porções amorfas e cristalinas nas microfibrilas de celulose.....	20
Figura 3 -	Ilustração descrevendo a origem da celulose e o método de processamento utilizado para obtenção dos nanocristais de celulose (CNCs).....	28
Figura 4 -	(A) Foto da dispersão de CNCs em água. (B) Micrografia obtida por TEM dos CNCs oxidados por TEMPO. (C) Imagem obtida por AFM dos CNCs oxidados por TEMPO. (D) Espectros de FTIR da biomassa rica em celulose e CNCs oxidados por TEMPO.....	35
Figura 5 -	Histogramas de distribuição de largura (A) e comprimento (B) de CNCs obtido através de medições via ImageJ.....	36
Figura 6 -	Taxa de viabilidade (%) de suspensões de <i>E. coli</i> incubadas por 3 h sob diferentes concentrações de CNCs. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao controle em um nível de confiança de 95%($\alpha=0,05$).....	37
Figura 7 -	Representação de células bacterianas interagindo com (A) filtros de PVDF não recobertos (B) e recobertos por CNCs na superfície. (C) Atividade antimicrobiana mediada por contato de superfícies após 3 h de exposição a células de <i>E. coli</i>	39
Figura 8 -	Fotos das superfícies de PVDF não-recobertas (A) e recobertas por CNCs (B), mostrando cor e aparência.....	39
Figura 9 -	Micrografias obtidas por SEM do filtro original de PDVF com tamanho de poro de 0,22 μm (A) e do filtro recoberto com CNCs (B).....	40
Figura 10 -	(A) Oxidação de glutathiona por CNC após 3 h de interação. (B) Ensaio de quantificação de EROs por fluorescência de bactérias expostas a CNC e H_2O_2	42

Figura 11 - Micrografias obtidas por SEM das células de <i>E. coli</i> após 3 h de contato com a superfície original dos filtros de PVDF 0,22 μm (A e C) e dos filtros recobertos por CNCs (B e D).....	45
Figura 12 - (A) Representação esquemática da interação entre CNC e vesículas lipídicas. (B) Absorbância relativa a 500 nm de suspensões de vesículas lipídicas após interagirem com CNC a 200 e 500 $\mu\text{g/mL}$, e sem qualquer interação com os nanocristais (controle).....	46
Figura 13 - (A) Histograma de distribuição do diâmetro das vesículas de laranja de acridina/DPPC obtido através de medidas via ImageJ. (B) Exemplo de imagem usada para medições do diâmetro das vesículas.....	47
Figura 14 - (A) Micrografia obtida por TEM dos nanocristais de celulose oxidados por TEMPO. (B) Espectro FTIR do substrato rico em celulose e dos CNCs oxidados por TEMPO. Histogramas com distribuição de largura (C) e comprimento (D) dos CNCs.....	59
Figura 15 - Esquema de reação para a ligação covalente de CNCs na camada ativa de poliamida das membranas de TFC.....	60
Figura 16 - Imagens da membrana de TFC original (A) e da membrana CNC-TFC (B).....	60
Figura 17 - Micrografias de SEM da superfície de membranas não modificadas (A) e funcionalizadas com CNCs (B). Mapa de rugosidade AFM (esquerda) 2D e (direita) 3D para superfície das membranas de TFC (C) e CNC-TFC (D). As setas verdes indicam agregados de CNCs.....	62
Figura 18 - Espectros obtidos por FTIR das membranas TFC originais e funcionalizadas com CNCs.....	63
Figura 19 - Espectros “survey” de XPS para membranas TFC e CNC-TFC (A), espectro C 1s para TFC membrana (B), espectro C 1s para membrana CNC-TFC (C), espectro O 1s para membrana TFC (D), espectro O 1s para membrana CNC-TFC (E).....	64
Figura 20 - Composição elementar obtida por análise de EDS das membranas TFC e CNC-TFC.....	66

Figura 21 - Propriedades intrínsecas de transporte (A) e ângulos de contato para membranas originais e funcionalizadas com CNCs (B).....	68
Figura 22 - Representação esquemática da unidade de filtração por osmose reversa....	68
Figura 23 - (A) Taxas de viabilidade para suspensões de E. coli incubadas por 3h com membranas TFC e CNC-TFC. Micrografias obtidas por SEM mostrando a integridade celular de bactérias na superfície de membranas de TFC (B) e CNC-TFC (C, D).....	70
Figura 24 - Ilustração do processo completo de síntese CNC/Ag.....	82
Figura 25 - (A) Fotos de dispersões CNC e CNC/Ag, (B) Micrografia obtida por TEM de partículas CNC/Ag, (C) espectros de absorção UV-vis de dispersões de CNC e CNC/Ag, e (D) histograma com distribuição de tamanho de AgNPs ancoradas nos CNCs.....	83
Figura 26 - Perfis de difração de raios X de CNC, CNC/Ag e prata em pó (Ag).....	84
Figura 27 - Análise termogravimétrica de CNC e CNC/Ag.....	85
Figura 28 - Micrografias obtidas por TEM dos nanocristais de celulose.	86
Figura 29 - Espectros “survey” de XPS para CNC e material híbrido CNC/Ag (A), picos Ag 3d para CNC/Ag (B), espectro C 1s para CNC e CNC/Ag, respectivamente (C e D).....	87
Figura 30 - Espectros ATR-FTIR de CNC e CNC/Ag.....	88
Figura 31 - Perfil de liberação de Ag ⁺ do CNC/Ag em água em função do tempo. A concentração equivalente de íons prata liberados por 1 mg de CNC/Ag foi calculada a partir de valores de ppb obtidos diretamente por GFAAS..	89
Figura 32 - Distribuição de potencial zeta para CNC (verde) e CNC/Ag (azul) em pH 5. Os potenciais zeta médios para CNC e CNC/Ag foram $-54,6 \pm 13,9$ e $-54,0 \pm 6,81$ mV, respectivamente. Os dados representam a média de três medições.....	90
Figura 33 - Viabilidade de bactérias aderidas (A, E. coli; B, B. subtilis) após exposição às superfícies. Imagens de SEM mostrando células de E. coli e de B. subtilis após exposição a filtros PDVF (C, D), revestidos com CNC (E, F) e revestidos com CNC/Ag (G, H).....	92

Figura 34 - Projeções 3D obtidas por CLSM representando a estrutura de biofilmes de <i>E. coli</i> (A) e <i>B. subtilis</i> (B) cultivados sobre as diferentes superfícies após incubação por 18 h. Biovolume médio de bactérias não viáveis para <i>E. coli</i> (C) e <i>B. subtilis</i> (D).....	95
Figura 35 - Absorbância (OD600) de suspensões de <i>E. coli</i> expostas a CNCs (A) e CNC/Ag (B). Absorbância de suspensões de <i>B. subtilis</i> incubados com CNCs (C) e CNC/Ag (D).....	97
Figura 36 - Poços de microplacas com concentrações crescentes de CNCs da esquerda para a direita. Em concentrações mais altas de CNCs, um padrão de esporulação para <i>B. subtilis</i> é observado.....	97
Figura 37 - Diâmetro hidrodinâmico de CNC/Ag (300 µg/mL) disperso em caldo LB e água deionizada ao longo de 6 h de medições de DLS.....	99
Figura 38 - Espectros UV-Vis de CNC/Ag disperso em caldo LB a uma concentração de 100 µg/mL. Os espectros foram adquiridos a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 h de incubação.....	100
Figura 39 - Cinética de crescimento de <i>E. coli</i> (A) e <i>B. subtilis</i> (B) expostos a CNC ou CNC/Ag. (C) Valor da redução de log (UFC/mL) após exposição de células de <i>E. coli</i> e <i>B. subtilis</i> a CNC/Ag.....	101
Figura 40 - (A) Absorbância relativa a 500 nm de suspensão de vesículas após interação com os nanomateriais (B) Oxidação da GSH por CNCs e CNC/Ag após 3 h de contato. (C) Quantificação de EROs por fluorescência de bactérias expostas a CNC/Ag e menadiona.....	104
Figura 41 - Ilustração demonstrando o mecanismo pelo qual as superfícies revestidas com CNCs e CNC/Ag inativam as células bacterianas aderidas.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resumo das intensidades relativas dos picos obtidos por análise de XPS das membranas de TFC e CNC-TFC.....	65
Tabela 2 -	Razões atômicas N/C, O/N e O/C obtidas por análise de EDS das membranas TFC e CNC-TFC.....	66
Tabela 3 -	CIM e CBM para CNC e CNC/Ag testados em <i>E. coli</i> e <i>B. subtilis</i>	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ab _{Smax}	Absorbância máxima
AFM	Microscopia de força atômica
ATR	Reflexão total atenuada
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSM	Microscopia confocal de varredura à laser
CNC	Nanocristal de celulose
CNF	Nanofibrila de celulose
CNT	Nanotubo de carbono
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DI	deionizada
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNTB	5,5'-ditiobis (2- ácido nitrobenzoico)
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
ED	Etilenodiamina
EDC	Hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
EDS	Espectroscopia dispersiva de raios X
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GSH	Glutathione (forma reduzida)
GO	Óxido de grafeno
H ₂ DCF	2,7-diclorodihidrofluoresceína
H ₂ DCFA	Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
HEK	embrionário de rim humano
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfônico
HMDS	Hexametildisilazano
IC	Concentração inibitória
LB	Luria Bertani
MES	Ácido 2-morfolin-4-iletanesulfônico
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina

NHS	N-hidróxisuccinimida
PI	Iodeto de propídio
PD	Polidopamina
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
PVC	Policloreto de vinila
rpm	Rotações por minuto
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SLS	Lauril sulfato de sódio
SPR	Ressonância plasmônica de superfície
SWCNT	Nanotubo de carbono de parede simples
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TEMPO	(2,2,6,6-Tetrametilpiperidin-1-il)oxil
TFC	Compósito de filme fino
TNB	3-tio-6-nitrobenzoato
Tris-HCl	Hidrocloreto de tris(hidroximetil)aminometano
UFC	Unidades formadoras de colônia
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X
XRD	Difração de raios X

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	19
2	CAPÍTULO I: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE REVESTIMENTOS E SUSPENSÕES DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE.....	23
2.1	Introdução.....	23
2.2	Objetivos.....	25
2.3	Materiais e métodos.....	25
2.3.1	<i>Reagentes e soluções.....</i>	<i>25</i>
2.3.2	<i>Preparação dos nanocristais de celulose.....</i>	<i>26</i>
2.3.3	<i>Caracterização dos nanocristais de celulose.....</i>	<i>28</i>
2.3.4	<i>Preparação de suspensão bacteriana.....</i>	<i>29</i>
2.3.5	<i>Atividade antimicrobiana de nanocristais de celulose em suspensão.....</i>	<i>29</i>
2.3.6	<i>Atividade antimicrobiana de superfícies recobertas com nanocristais de celulose</i>	<i>30</i>
2.3.7	<i>Caracterização morfológica das células bacterianas aderidas.....</i>	<i>30</i>
2.3.8	<i>Oxidação in vitro de glutathione após exposição a nanocristais de celulose.....</i>	<i>31</i>
2.3.9	<i>Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares formadas pela exposição a nanocristais de celulose.....</i>	<i>32</i>
2.3.10	<i>Preparação de vesículas com corante encapsulado.....</i>	<i>33</i>
2.3.11	<i>Ensaio de extravasamento de corante.....</i>	<i>33</i>
2.4	Resultados e Discussão.....	34
2.4.1	<i>Propriedades físico-químicas dos nanocristais de celulose.....</i>	<i>34</i>
2.4.2	<i>Propriedades antimicrobianas dos nanocristais de celulose em suspensão.....</i>	<i>36</i>
2.4.3	<i>Propriedades antimicrobianas de superfícies revestidas por nanocristais de celulose.....</i>	<i>38</i>
2.4.4	<i>Propriedades oxidativas dos nanocristais de celulose.....</i>	<i>41</i>
2.4.5	<i>Mecanismos de estresse físico mediados por nanocristais de celulose.....</i>	<i>43</i>
2.5	Conclusão.....	48
3	CAPÍTULO II: APLICAÇÃO DE REVESTIMENTO DE CNCs COMO AGENTE ANTI-INCRUSTAÇÃO BIOLÓGICA EM MEMBRANAS DE FILTRAÇÃO.....	50
3.1	Introdução.....	50
3.2	Objetivos.....	51

3.3	 Materiais e métodos.....	51
3.3.1	<i> Materiais e reagentes.....</i>	51
3.3.2	<i> Preparação dos nanocristais de celulose.....</i>	52
3.3.3	<i> Caracterização dos nanocristais de celulose.....</i>	52
3.3.4	<i> Funcionalização das membranas de compósitos de filme fino (TFC) com nanocristais de celulose.....</i>	53
3.3.5	<i> Caracterização das membranas de compósito de filme fino originais e funcionalizadas com CNC.....</i>	54
3.3.6	<i> Atividade antimicrobiana das membranas funcionalizadas com nanocristais de celulose.....</i>	56
3.3.7	<i> Características morfológicas das células bacterianas aderidas às membranas.....</i>	57
3.4	 Resultados e Discussão.....	57
3.4.1	<i> Caracterização físico-química dos CNCs.....</i>	57
3.4.2	<i> Caracterização das membranas funcionalizadas com CNCs.....</i>	59
3.4.3	<i> Avaliação das propriedades de transporte da membrana.....</i>	66
3.4.4	<i> Determinação da atividade antimicrobiana das membranas.....</i>	68
3.5	 Conclusão.....	70
4	 CAPÍTULO III: OPTIMIZAÇÃO DE PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DE REVESTIMENTOS DE CNCs COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	71
4.1	 Introdução.....	71
4.2	 Objetivos.....	72
4.3	 Materiais e métodos.....	73
4.3.1	<i> Preparação e caracterização de nanomateriais híbridos CNCs-Prata (CNC/Ag)..</i>	73
4.3.3	<i> Análise termogravimétrica.....</i>	74
4.3.4	<i> Medições de potencial zeta.....</i>	74
4.3.5	<i> Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS)</i>	75
4.3.6	<i> Análise de estabilidade com espectroscopia UV-Vis.....</i>	75
4.3.7	<i> Atividade anti-bioincrustação das superfícies recobertas com CNC e CNC/Ag....</i>	75
4.3.8	<i> Caracterização morfológica das bactérias aderidas.....</i>	76
4.3.9	<i> Propriedades antibacterianas de CNC e CNC/Ag em células bacterianas planctônicas.....</i>	76

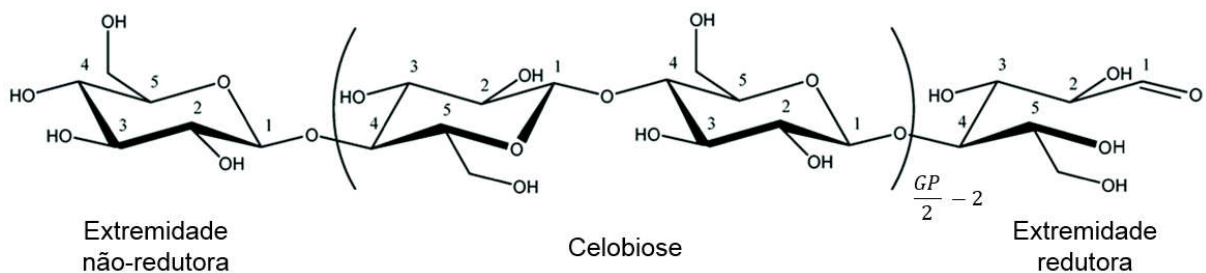
4.3.10	<i>Avaliação de cinética de toxicidade de bactérias planctônicas expostas a CNCs e CNC/Ag.....</i>	77
4.3.11	<i>Oxidação in vitro de GSH após exposição a CNC e CNC/Ag.....</i>	78
4.3.12	<i>Quantificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares provenientes da exposição a CNC/Ag.....</i>	79
4.3.13	<i>Preparação de vesículas lipídicas contendo corante e ensaio de extravasamento de corante.....</i>	79
4.3.14	<i>Caracterização de biofilme através de microscopia confocal.....</i>	80
4.4	Resultados e Discussão.....	81
4.4.1	<i>Caracterização do CNC/Ag.....</i>	81
4.4.2	<i>Inativação de bactérias aderidas nas superfícies recobertas por CNC e CNC/Ag.....</i>	90
4.4.3	<i>Atividade antibacteriana de suspensões de CNC e CNC/Ag em bactérias planctônicas.....</i>	95
4.4.4	<i>Cinética de atividade antibacteriana de CNC e CNC/Ag em bactérias planctônicas.....</i>	101
4.4.5	<i>Mecanismos de ação relacionados a toxicidade de CNC/Ag contra bactérias.....</i>	103
4.5	Conclusão.....	106
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	108
	REFERÊNCIAS.....	110

1 INTRODUÇÃO GERAL

A celulose é um dos biopolímeros mais abundantes existentes no planeta. Presente na composição da parede celular vegetal, esse polissacarídeo costuma ser comercialmente obtido da madeira de plantas superiores, chegando a uma produção anual da ordem de 10^{12} toneladas. Além da polpa da madeira, uma variedade infindável de fontes pode ser utilizada para obtenção desse biopolímero, tais como folhas, fibras (*e. g.* algodão e juta), resíduos da agricultura, entre outras. Também é possível obter celulose de certas bactérias, algas, fungos, invertebrados e diversos animais marinhos. Ao longo do tempo, a celulose foi predominantemente empregada na produção de papel, produtos têxteis, roupas, materiais de construção e como fonte de energia. Desde seu descobrimento em 1838 pelo químico francês Anselme Payen, os aspectos fisicoquímicos desse material têm sido extensivamente estudados nas mais diversas áreas do conhecimento (Flauzino Neto *et al.*, 2013; Grishkewich *et al.*, 2017; Islam *et al.*, 2018; Kempainen *et al.*, 2014).

A celulose é um polissacarídeo de cadeia longa de alto peso molecular, composto por repetições de unidades do dissacarídeo celobiose. Cada unidade de celobiose é composta por duas moléculas de anidro-D-glicopiranosose juntas por uma ligação glicosídica β -1,4. O número de unidades de anidro-D-glicopiranosose presentes em cada molécula de celulose (denominado grau de polimerização) é dependente da sua origem, processo de extração e de tratamento, podendo variar de algumas centenas até 20.000. Toda cadeia de celulose é quimicamente assimétrica, apresentando um extremidade redutora e outra não-redutora (Islam *et al.*, 2018). A estrutura química do biopolímero celulose é representada abaixo (Figura 1):

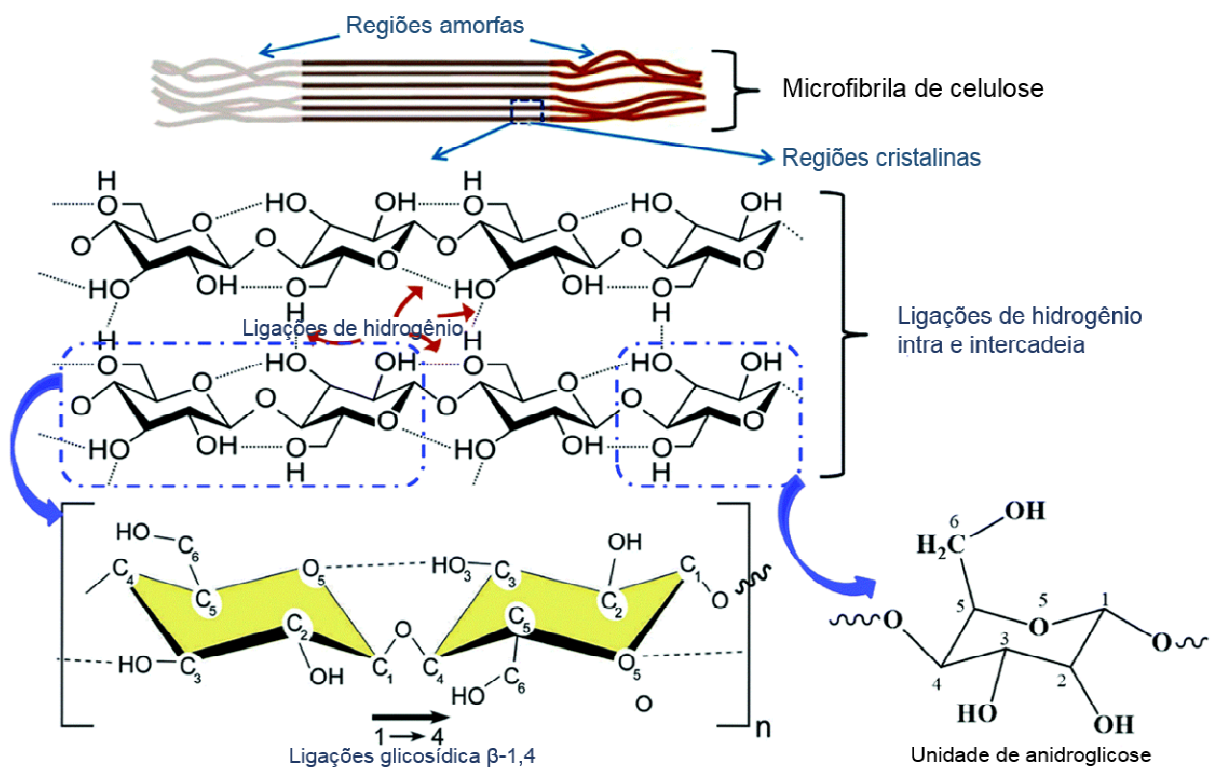
Figura 1 - Estrutura química da celulose.



Adaptado de Islam *et al.*, 2018.

Nas plantas superiores, as moléculas de celulose são organizadas em estruturas supramoleculares denominadas microfibrilas, que se arranjam através da estabilização proveniente de ligações de hidrogênio e interações de van der Waals intra e intercadeias, resultando na formação das fibras de celulose (Figura 2). Essas microfibrilas possuem da ordem de 10 a 50 nm de diâmetro, apresentando alternância entre domínios altamente organizados (cristalinos) e regiões desordenadas (amorfas). A extração das porções cristalinas presentes na celulose pode ser realizada por métodos químicos, mecânicos ou através de combinações desses tratamentos. A metodologia mais empregada para a extração dos domínios cristalinos e produção dos nanocristais de celulose (CNCs) é a hidrólise ácida, onde ácido clorídrico, sulfúrico ou fosfórico são mais comumente utilizados. A desestruturação das fibras celulósicas realizada pela hidrólise ácida consiste na clivagem das ligações glicosídicas entre microfibrilas de celulose e dissolução de suas regiões amorfas, resultando no corte longitudinal das microfibrilas e obtenção de nanopartículas em formato de bastão ou *whiskers* com alta razão de aspecto. Os nanocristais de celulose obtidos costumam apresentar larguras entre 2 e 50 nm e comprimentos da ordem de 100 a 2000 nm (Dufresne, 2017; Islam *et al.*, 2018).

Figura 2 - Porções amorfas e cristalinas nas microfibrilas de celulose.



Adaptado de Islam *et al.*, 2018.

Em decorrência de suas propriedades, os nanocristais de celulose têm recebido grande atenção da comunidade científica na área de ciência dos materiais. Por exemplo, em virtude de sua dimensão nanométrica e baixa densidade, os CNCs apresentam um elevado valor de área superficial específica, na escala de 150 a 250 m²/g. Algumas das propriedades mecânicas, tais como o módulo de elasticidade (módulo de Young) e a resistência à tração, são comparáveis a de nanomateriais de reforço como nanotubos de carbono, apresentando valores da ordem de 110-220 GPa e 7,5-7,7 GPa, respectivamente. Outras características físico-químicas atrativas dos CNCs são biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixo risco ecotoxicológico, transparência óptica, anisotropia, elasticidade, estabilidade térmica e química de superfície controlável. Todas essas propriedades possibilitaram a aplicação dos CNCs na preparação de materiais ecologicamente amigáveis de baixo custo em diversas áreas, incluindo compósitos, membranas de separação, filmes, imobilização de enzimas, supercapacitores, filmes antimicrobianos, implantes médicos, catálise verde, estabilizante de emulsões, entrega de fármacos, biossensores, baterias e dispositivos eletrônicos (Grishkewich *et al.*, 2017; Islam *et al.*, 2018; Trache *et al.*, 2017).

Uma das aplicações mais recorrentes dos CNCs na literatura é sua utilização como agente reforçador na preparação de materiais nanocompósitos. Esses materiais se caracterizam pela presença de dois ou mais componentes, com pelo menos um deles apresentando uma das dimensões com tamanho inferior a 100 nm. Presente nas plantas como o agente responsável por proporcionar força, estabilidade e rigidez às paredes celulares, a presença da celulose, na forma de nanocristais, em matrizes poliméricas possibilita que esses nanocompósitos usufruam de suas propriedades físico-químicas e mecânicas. (Thompson *et al.*, 2019). A incorporação de CNCs à matrizes poliméricas de poliácido láctico (PLA), polimetilmetacrilato (PMMA), poliuretano, poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) e resinas de poliésteres insaturados resultou em melhorias significativas de propriedades mecânicas, tais como resistência à tração e módulo de elasticidade (módulo de Young) (Thompson *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2018).

As propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade a seres humanos, aliados à uma química de superfície facilmente modificável, tornam os CNCs bastante atraentes para aplicações biomédicas. A modificação da superfície dos CNCs permite a utilização do nanomaterial como agente carreador de fármacos (Seabra *et al.*, 2018;

Thompson *et al.*, 2019). CNCs foram conjugados de forma bem-sucedida a agentes antibacterianos, antivirais, genes e biomarcadores, servindo como vetor de transporte para estas moléculas (Grishkewich *et al.*, 2017; Seabra *et al.*, 2018). Outra aplicação recorrente dos CNCs na área biomédica é sua utilização como *scaffolds* em engenharia de tecidos. A baixa densidade, alta razão de aspecto e capacidade de reforçar matrizes poliméricas aliada à promoção de proliferação celular pelos CNCs possibilita sua aplicação em regeneração de tecido ósseo, enxertos vasculares, melhoria na adesão de implantes ósseos e *scaffold* injetável para tecidos (Aziz *et al.*, 2021; Grishkewich *et al.*, 2017; Shojaeiarani, Bajwa e Chanda, 2021).

Outra interessante possibilidade de aplicação dos CNCs é na produção de filmes e revestimentos para utilização em sistemas de filtração e tratamento de efluentes (Shojaeiarani, Bajwa e Chanda, 2021). Em virtude de suas elevadas hidrofiliçidade, rigidez e área superficial, os CNCs podem ser utilizados para a melhoria de propriedades nesses sistemas. Uma vez que sistemas de filtração de alta performance operam sob condições de alta pressão, a rigidez e resistência mecânica dos CNCs são características importantes para utilização nesse tipo de aplicação. Já a hidrofiliçidade, decorrente da abundância de hidroxilas na estrutura da celulose, faz com que esses materiais sejam menos susceptíveis à incrustação de moléculas orgânicas ou organismos biológicos. Além disso, o elevado grau de cristalinidade dos CNCs os torna quimicamente inertes sob a maioria das condições encontradas em sistemas de filtração. A combinação das propriedades mencionadas possibilita que os CNCs sejam um material promissor para utilização na remoção seletiva de contaminantes da água (Voisin *et al.*, 2017).

2 CAPÍTULO I: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE REVESTIMENTOS E SUSPENSÕES DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE

2.1 Introdução

O desenvolvimento de revestimentos antimicrobianos é uma estratégia de grande importância na mitigação da colonização de superfícies por microrganismos (Ahonen *et al.*, 2017; Mebert *et al.*, 2016). A colonização bacteriana e a consequente formação de biofilmes podem ter impactos negativos em diversas áreas, tais como: engenharia ambiental, transporte marítimo, tecnologia de alimentos e medicina (Garrett, Bhakoo e Zhang, 2008; Hori e Matsumoto, 2010). O crescimento de biofilmes em dispositivos médicos, por exemplo, pode resultar no surgimento de infecções crônicas, resultando em custos anuais de hospitalização maiores do que \$1 bilhão de dólares nos EUA (Khatoon *et al.*, 2018; Pinto *et al.*, 2019). De forma geral, a acumulação de biofilmes sobre estruturas pode resultar na diminuição de sua eficiência e aumento nos custos (Mebert *et al.*, 2016).

Polímeros zwitteriônicos, compostos quaternários de amônio e nanomateriais como óxido de grafeno (Adlhart *et al.*, 2018; Cloutier, Mantovani e Rosei, 2015; Perreault *et al.*, 2015) e nanopartículas de prata (Ahonen *et al.*, 2017) têm sido aplicados como revestimentos antimicrobianos para prevenir a adesão microbiana ou inativar bactérias aderidas através do contato ou liberação de íons tóxicos. Entretanto, polímeros zwitteriônicos, materiais à base de carbono e nanopartículas metálicas apresentam riscos ao meio ambiente e limitações quanto à sua capacidade de escalonamento. Escovas poliméricas apresentam alta eficiência em prevenir a incrustação de compostos orgânicos e a bioincrustação (Liu, Lee, Small, *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2014), porém necessitam de um processo de síntese laborioso e do uso de compostos químicos nocivos. A produção de nanomateriais à base de carbono também podem demandar processos complicados e prolongados (Han *et al.*, 2019; Hassan *et al.*, 2019). Nanopartículas metálicas podem ser facilmente sintetizadas e sua toxicidade a microrganismos é amplamente estudada (Das *et al.*, 2017). Entretanto, sua toxicidade a organismos aquáticos, persistência no ambiente e habilidade de ativar mecanismos de resistências microbianos limitam sua aplicação (Ahonen *et al.*, 2017). Além disso, há uma real demanda pela formulação de nanomateriais antimicrobianos que sejam ambientalmente sustentáveis, baratos e de fácil processamento em larga escala.

Neste contexto, a celulose surge como uma fonte natural que pode ser convertida em nanomateriais bioativos sustentáveis e com fácil funcionalização (Muñoz-Bonilla *et al.*, 2019). Celulose é um material abundante na natureza, uma vez que está presente na composição da parede celular vegetal, podendo ser extraído de uma grande variedade de fontes, tais como folhas, fibras (*e. g.* algodão e juta), madeira e resíduos da agricultura (Flauzino Neto *et al.*, 2013; Grishkewich *et al.*, 2017; Kemppainen *et al.*, 2014). A estrutura química da celulose é baseada em cadeias lineares de unidades de D-glicose ligadas por ligações β , tais unidades são ricas em grupos funcionais hidroxilas (Klemm *et al.*, 2005). Em virtude de sua baixa pegada de carbono e natureza sustentável, a celulose é um matéria-prima inesgotável na natureza, podendo ser rapidamente transformada em nanomateriais para a mais diversa gama de aplicações (Grishkewich *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2017).

A celulose extraída de fontes vegetais pode ser convertida em nanofibrilas de celulose (CNFs) e nanocristais de celulose (CNCs) (Dufresne, 2017; Trache *et al.*, 2017). As principais diferenças entre CNFs e CNCs dizem respeito ao seu comprimento e cristalinidade, com os CNCs apresentando tipicamente um menor tamanho e maior cristalinidade que os CNFs, características decorrentes de seus métodos de preparação. CNFs são produzidas a partir de fibras lignocelulósicas ricas em celulose, através da aplicação de intensos mecanismos de cisalhamento, resultando em filamentos flexíveis que alternam entre domínios amorfos e cristalinos e podem alcançar comprimentos maiores que 1 μm (Dufresne, 2017; Nascimento e Rezende, 2018; Seabra *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2017). Em contraste, CNCs possuem uma estrutura altamente cristalina em forma de bastão e podem ser normalmente obtidos através da hidrólise de substratos celulósicos, resultando na dissolução de domínios amorfos e no corte longitudinal das microfibrilas.

CNCs tem atraído atenção em virtude de suas propriedades excepcionais, tais como transparência óptica, anisotropia, elasticidade, baixa densidade, e altas resistência à tração (7500 MPa), rigidez (valores de módulo de Young de até 140 GPa) e área superficial ($\sim 250 \text{ m}^2/\text{g}$) (Grishkewich *et al.*, 2017; Trache *et al.*, 2017). Outra importante característica dos CNCs é a alta capacidade de modificação de sua superfície, o que permite à otimização de suas propriedades físico-químicas a fim de atender demandas específicas. Devido sua rigidez, alta razão de aspecto e abundância de grupos funcionais contendo oxigênio, os CNCs têm o potencial de ser aplicado como uma nova classe de revestimento antimicrobiano para o desenvolvimento de superfícies anti-incrustação biológica (Muñoz-Bonilla *et al.*, 2019; Seabra *et al.*, 2018). Estudos prévios mostraram a incorporação de CNCs em resinas químicas,

lenços de papel, material de embalagem e tintas como estratégia para fornecer propriedades antimicrobianas a estes materiais (El-Samahy *et al.*, 2017; Tyagi *et al.*, 2019). Têm sido proposto na literatura que os CNCs podem inativar microrganismos através da perfuração de suas membranas, devido sua estrutura rígida e pontiaguda (Tyagi *et al.*, 2019). Entretanto, o mecanismo por trás da toxicidade do CNC a bactérias ainda não é totalmente compreendido.

2.2 Objetivos

- Investigar a toxicidade de CNCs a células bacterianas utilizando *Escherichia coli* como microrganismo modelo.
- Realizar a caracterização físico-química do nanomaterial através de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM).
- Avaliar suas propriedades antimicrobianas através do uso de suspensões aquosas e de recobrimentos sobre superfícies, utilizando a determinação do número de bactérias inativadas através de contagem em placa como ferramenta de análise.
- Investigar os mecanismos envolvidos na interação entre CNCs e bactérias, focando-se em processos oxidativos e mecanismos mediados por contato.

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Reagentes e soluções

O (2,2,6,6-Tetrametilpiperidin-1-il)oxil (TEMPO, 98%) e o ácido 4-(2-Hidróxietil)piperazina-1-etanosulfônico (HEPES, ≥ 99.5 %) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO - EUA). Cloreto de sódio (NaCl - Cristalino/Certificado ACS), Caldo LB Miller, ágar (pó/flocos), fosfato de sódio dibásico (anidro, certificado ACS), fosfato de sódio monobásico (anidro, ≥ 99 %), etanol absoluto, tris(hidróximetil)aminometano hidrocloreto (Tris-HCl, 99%), lauril sulfato de sódio (SLS), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC, ≥ 98 %), dimetil sulfóxido (DMSO, $\geq 99,7$ %), e peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 30-32 %) foram obtidos da Fisher Scientific. Glutaraldeído (solução aquosa 50%, grau microscopia eletrônica), paraformaldeído (solução aquosa 16%, grau microscopia eletrônica),

e hexametildisilazano (> 97%) foram obtidos da Electron Microscopy Sciences (Hatfield – PA, EUA). Glutathiona (98%) foi obtida da Acros Organics. 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DNTB ou reagente de Ellman, 99%) e laranja de acridina foram adquiridos da Alfa Aesar. Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFA, 94%) foi obtido da EMD Millipore Cal Nov. Ácido sulfúrico (H₂SO₄, 98%), hidróxido de sódio (NaOH, certificado ACS), brometo de sódio (NaBr, certificado ACS) e hipoclorito de sódio (NaClO, 10-12%) foi obtido da Synth (Diadema - SP, Brasil). Acetato de uranila (> 99%) foi adquirido da Fluke Chemie AG (Buchs, Suíça). A menos que especificado de outra forma, todos os químicos foram dissolvidos em água deionizada (DI) com resistência de 18,2 MΩ·cm obtidas de um sistema de purificação de água Milli-Q® Direct Water Purification System (EMD Millipore, Burlington - MA, EUA).

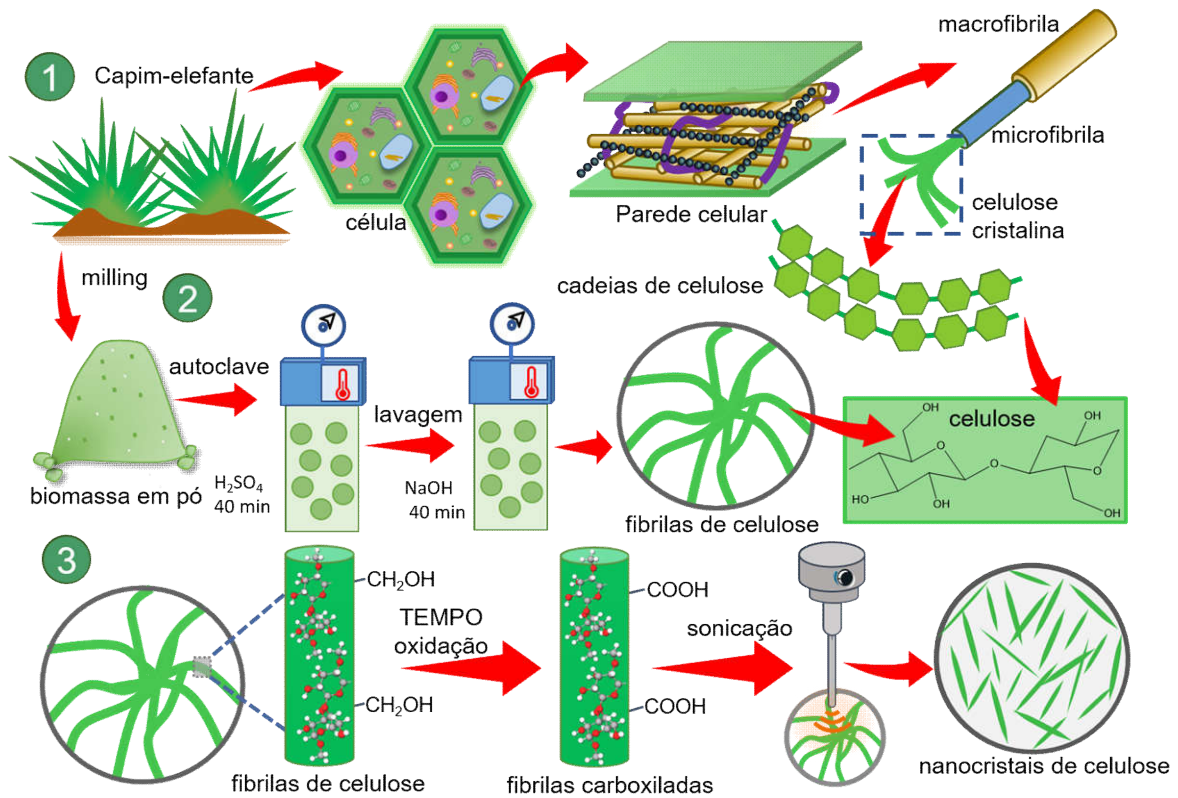
2.3.2 *Preparação dos nanocristais de celulose*

Folhas de capim-elefante foram colhidas 12 meses após o plantio e separadas entre folhas e hastes. As folhas foram secas em uma estufa de convecção (Tecnal TE-394/3, Piracicaba, Brasil) a 60°C por 24 h e moídas em moinho de facas até atravessarem uma peneira de 10-mesh (poros de 2 mm) (SOLAB – SL 31, Piracicaba, Brasil). Em sequência, a biomassa moída foi armazenada em frascos de polipropileno até uso posterior.

As folhas de capim-elefante moídas foram pré-tratadas hidrotermicamente em um processo de duas etapas em autoclave (Phoenix AV-75, Araraquara – SP, Brasil), conforme descrito em estudo anterior publicado (Nascimento e Rezende, 2018). Brevemente, 100 g de capim-elefante moído (peso seco) foram misturados a 1000 mL de uma solução de H₂SO₄ (1% v/v) e mantida a 121°C e 1,05 bar em autoclave por 40 min. Este tratamento hidrotermal sob condições ácidas promove a remoção preferencial de hemicelulose e extrativos (Rocha *et al.*, 2011). A biomassa tratada com ácido foi então lavada com água deionizada e 50 g (peso seco) da biomassa foram recuperados. Seguido a este procedimento, a biomassa tratada com ácido foi submetida a um segundo tratamento hidrotérmico na presença de 1000 mL de NaOH 2% (m/v) nas mesmas condições aplicadas no tratamento ácido (121°C, 1,05 bar, 40 min). Essa etapa foi realizada para a remoção de lignina da biomassa tratada com ácido (Rezende *et al.*, 2011). Uma massa de 30 g (peso seco) de fibras ricas em celulose foi obtida depois do tratamento alcalino e o produto final foi lavado, seco e moído em moinho de facas até atravessar uma peneira de 20-mesh (poros de 0,8 mm).

No presente trabalho, CNCs foram preparados através de oxidação mediada por TEMPO, seguida de sonicação (Pinto, Bernardes e Rezende, 2019; Zhou *et al.*, 2018). Oxidação mediada por TEMPO converte os grupos hidroxila de C6 primários em ácidos carboxílicos, aumentando a repulsão eletrostática e melhorando a defibrilação e fragmentação das fibras ricas em celulose em nanocristais de celulose (Pinto, Bernardes e Rezende, 2019; Zhou *et al.*, 2018). Uma quantidade de 1 g de biomassa pré-tratada foi suspensa em 100 mL de água deionizada e oxidada com TEMPO (0,016 g), NaBr (0,1 g), e NaClO (4,5 g) sob constante agitação por 2 h e 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, o precipitado foi concentrado e repetitivamente lavado com água deionizada via centrifugação a 3500 rpm por 10 min. A suspensão de fibras de celulose oxidadas foi homogeneizada utilizando um dispersor Ultra Turrax (IKA T25, Staufen, Alemanha) a 7000 rpm por 30 min. Em seguida, as fibras foram submetidas a ultrassonicação por ponta (Eco-Sonics QR550, 330 watts, Indaiatuba, Brasil) durante 60 min (60% de oscilação de amplitude) para promover a defibrilação e quebra mecânica de celulose oxidada por TEMPO e formação dos CNCs (Pinto, Bernardes e Rezende, 2019; Zhou *et al.*, 2018). O rendimento de CNCs recuperados foi medido através de uma balança de infravermelho (METTLER TOLEDO MD-20, Columbus, EUA). Uma ilustração esquemática do processo de síntese é representada na Figura 3.

Figura 3 - Ilustração descrevendo a origem da celulose e o método de processamento utilizado para obtenção dos nanocristais de celulose (CNCs).



Adaptado de Noronha *et al.*, 2021.

2.3.3 Caracterização dos nanocristais de celulose

As características químicas da biomassa pré-tratada (folhas de grama-elefante após tratamento hidrotérmico com ácido e base) e filmes de CNCs foram analisados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em modo de reflexão total atenuada (ATR) usando um espectrômetro Agilent Cary 630 FTIR (Santa Clara, EUA). Medições de potencial zeta da dispersão de CNCs (100 $\mu\text{g/mL}$) foram realizadas utilizando um equipamento Zetasizer® 300HS (Malvern, Reino Unido). Por fim, as características morfológicas dos CNCs foram avaliadas utilizando um microscópio de transmissão eletrônica (TEM) Carl Zeiss LIBRA 120 (Oberkochen, Alemanha) e um microscópio de varredura Shimadzu WET-SPM (Quioto, Japão). Para a análise de TEM, uma alíquota da dispersão de CNCs (10 $\mu\text{g/mL}$) foi depositada sobre uma grade de cobre com filme de carbono para microscopia de 400 mesh, corada com solução de acetato de uranila 2% (v/v), e seca antes da análise em dessecador por 2 h a temperatura ambiente. Um total de 150 partículas nas imagens de TEM foram analisadas utilizando o software ImageJ a fim de determinar o

comprimento e largura médios do nanomaterial. Para análises morfológicas complementares, microscopia de força atômica (AFM) foi realizada em modo não contato, utilizando uma sonda NHCR (PointProbe® Silicon SPM-Sensor NANOWORLD; frequência de ressonância: 320 kHz, constante de força: 42 N/m, e espessura: 4 µm). A preparação de amostra consistiu na deposição de 10 µL da dispersão de CNCs (5 µg/mL) em um substrato de mica e secagem em dessecador por 4 h a temperatura ambiente anteriormente à análise. Mais de 20 imagens foram obtidas em uma taxa de varredura de 0,5 Hz e resolução de 512 x 512 pixels. O tratamento das imagens foi realizado no software Gwyddion 2.56 (Gwyddion.net).

2.3.4 Preparação de suspensão bacteriana

Escherichia coli (American Type Culture Collection ATCC 8739) foi cultivada de um dia para o outro em caldo LB a 37 °C em estufa microbiológica. Uma alíquota da suspensão foi diluída (1:25) em meio LB fresco e crescido sob agitação magnética a 37 °C até atingir uma densidade óptica a 600 nm próxima a 1, o que corresponde a fase exponencial (log) de crescimento (~2 h). Células bacterianas foram coletadas do meio por centrifugação e lavadas três vezes com solução salina estéril (NaCl 0,9%) para remoção do excesso de constituintes do meio. A suspensão foi então diluída em solução salina estéril para obtenção de uma concentração de 10⁸ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). Este protocolo foi utilizado para preparação de todas as suspensões utilizadas em ensaios antimicrobianos.

2.3.5 Atividade antimicrobiana de nanocristais de celulose em suspensão

Uma solução estoque de CNCs (3750 µg/mL) foi utilizada na preparação de frascos contendo as dispersões de CNCs com concentrações finais de 0 (controle), 25, 50, 125, 250, e 500 µg/mL. CNCs foram dispersos em solução salina (NaCl, 0,9%) e submetidos à sonicação em banho por 15 min antes de serem utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana. Um volume de 100 µL de uma suspensão bacteriana (10⁸ UFC/mL) foi adicionado a cada frasco, resultando em um volume final de 3 mL. Os frascos foram colocados em um agitador de tubos e mantidos sob agitação moderada em temperatura ambiente por 3 h. Depois de 3h de contato, os frascos foram sonicados em banho por 5 min, com o objetivo de romper qualquer aglomerado de CNCs. 100 µL da suspensão bacteriana de cada frasco foi diluída em série em solução salina estéril (NaCl, 0,9%) e 100 µL de cada diluição foi espalhada sob placas com

ágar LB. As placas foram incubadas até o dia seguinte a 37°C e então procedeu-se a contagem das colônias. Para cada amostra, a contagem em placa foi realizada em quadruplicata. Após a contagem, o valor em UFC/mL foi calculado e os resultados foram divididos pela média do controle para normalização e apresentação dos dados em termos de porcentagem de viabilidade.

2.3.6 Atividade antimicrobiana de superfícies recobertas com nanocristais de celulose

Uma dispersão de 750 µg/mL de CNC foi preparada e 4 mL foram filtrados através de um filtro de PVDF (tamanho de poro de 0,22 µm) em um dispositivo de filtração para a produção das superfícies recobertas por CNCs. Filtros de PDVF sem CNCs depositados foram utilizados como controle. Todos os tratamentos com superfícies recobertas com CNCs e controle foram preparados em quadruplicata. Para isso, 3 mL de suspensão bacteriana foram expostas às superfícies por 3 h. Depois do tempo de exposição, as suspensões bacterianas foram removidas com assistência de uma pipeta e os filtros foram cuidadosamente lavados duas vezes com 3 mL de solução salina (NaCl, 0,9 %), a fim de remover todas as células não aderidas. Cada filtro foi então disposto em um tubo de centrífuga contendo 10 mL de solução salina e sonificado em banho por 15 min para liberação das células de *E. coli* aderidas à superfície. Um volume de 100 µL de cada suspensão foi diluído em série e plaqueada em ágar LB. As placas foram incubadas a 37°C até o dia seguinte e a contagem foi realizada em quadruplicata, calculando-se o número médio de células viáveis. Resultados foram normalizados em relação ao controle e apresentados como porcentagem de viabilidade.

2.3.7 Caracterização morfológica das células bacterianas aderidas

Imagens de SEM das bactérias expostas às superfícies recobertas por CNCs e amostras controle foram coletadas para avaliação de suas características morfológicas. Após o contato do filtro com a suspensão bacteriana, as amostras foram gentilmente lavadas com solução salina (NaCl 0,9% m/v) e tampão de Sorensen (0,2 M, pH 7,2) para remoção de células não-aderidas. Após o processo de lavagem, as células aderidas ao filtro foram expostas a solução fixativa de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% diluídos em tampão de Sorensen 0,2 M, pH 7,2) por 3 h. A solução fixativa foi então removida e a superfície dos filtros foi lavada com o tampão de Sorensen e água deionizada. Após essa etapa de fixação, os filtros foram submetidos a uma série de soluções de água/etanol para realização do processo

de desidratação. Os filtros foram sequencialmente imersos em soluções de etanol (50:50, 30:70, 20:80, 10:90, 100% etanol) por 10 minutos, para cada solução, começando pela mais diluída e terminando no etanol absoluto. Em sequência, os filtros foram imersos por duas vezes em hexametildisilazano (HMDS, 97%) por 10 min em cada imersão. A secagem química das amostras usando HMDS é realizada para prevenir o colapso da estrutura bacteriana durante os processos de secagem e armazenamento das amostras (Hazrin-Chong e Manefield, 2012). Depois dos passos de desidratação, as amostras foram mantidas em dessecador até o dia seguinte sob temperatura ambiente. As amostras foram então montadas sobre suportes de alumínio e recobertas por uma camada de ouro-paládio através de *sputter-coating* em um *Sputter Coater* Denton Desk V. As bactérias foram observadas através de um microscópio eletrônico de varredura *Hitachi SU5000 Schottky Field-Emission* operando em uma aceleração de 5 kV. Amostras com superfícies que não foram expostas a suspensão bacteriana foram secas em dessecador por um dia a temperatura ambiente e levadas ao processo de *sputter coating*, sem a necessidade de qualquer tratamento adicional.

2.3.8 Oxidação *in vitro* de glutathiona após exposição a nanocristais de celulose

Oxidação *in vitro* da glutathiona (GSH) é amplamente utilizado no estudo do potencial oxidativo de nanomateriais (Hellack *et al.*, 2017). Glutathiona é um antioxidante naturalmente presente em sistemas biológicos e sua função é proteger as células contra o estresse oxidativo (Fahey *et al.*, 1978; Kurutas, 2015). Em um ambiente oxidativo, grupos contendo tiol (S-H) presentes na glutathiona reduzida são oxidados em pontes dissulfeto (S-S). A porcentagem de glutathiona reduzida pode ser correlacionada com o potencial oxidativo do nanomaterial (Hellack *et al.*, 2017). A quantificação de glutathiona não-oxidada é realizada através da reação de Ellman e foi usada como um indicador do potencial oxidativo dos CNCs, como realizado previamente para outros nanomateriais, nomeadamente óxido de grafeno (Barrios *et al.*, 2019; Faria, Perreault e Elimelech, 2018) e nanotubos de carbono (Pasquini *et al.*, 2013; Vecitis *et al.*, 2010).

Uma alíquota de 20 µL de uma solução de GSH 100 mM foi adicionada a 5,98 mL da dispersão de CNCs (200 µg/mL), tamponada com 600 µL de tampão bicarbonato (0,5 M, pH 8,6), resultando em uma concentração final de 4 mM de GSH. As amostras foram recobertas por papel alumínio e colocadas em um agitador orbital sob temperatura ambiente por 3 h. Ao fim do processo, uma alíquota de 900 µL da dispersão foi misturada com 30 µL do reagente de Ellman a 100 mM (solução etanólica) e 1570 µL de tampão Tris-HCl (1 M, pH 8,3). Um

volume de 1 mL da mistura resultante foi filtrado através de um filtro de seringa (tamanho de poro de 0,45 μm) para remoção de eventuais partículas suspensas. Os grupos tíóis não-oxidados do GSH reagem com o reagente de Ellman, produzindo TNB (3-tio-6-nitrobenzoato), um composto amarelado com absorção máxima a 412 nm. A absorção de TNB neste comprimento de onda foi quantificada em um espectrofotômetro (Hitachi U-2900, Japão), utilizando um comprimento óptico de 1 cm e um coeficiente de extinção de 14150 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A solução sem a adição de CNCs foi utilizada como controle. A oxidação de GSH por H_2O_2 foi utilizada como controle positivo. A quantidade de TNB presente pode ser diretamente relacionada à GSH em solução. A perda percentual de GSH foi calculada através da comparação com o controle (sem CNCs) e expressa em termos de perda de GSH.

2.3.9 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares formadas pela exposição a nanocristais de celulose

A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) dentro das células bacterianas decorrente da exposição a CNCs foi mensurada através da utilização da 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFA) como sonda. H_2DCFA é permeável a membrana de célula bacteriana e, uma vez que atinge o citosol bacteriano, pode ser hidrolisado a H_2DCF pela ação de esterases intracelulares e permanecer retido no interior das células (Barrios *et al.*, 2019; Hellack *et al.*, 2017). Com o acúmulo de EROs, as peroxidases dentro das células oxidam o H_2DCF a DCF, um composto altamente fluorescente. A intensidade de fluorescência resultante da conversão de H_2DCF em DCF é então medida e correlacionada com a presença de ROS dentro das células (Barrios *et al.*, 2019; Hellack *et al.*, 2017). Em contraste com o ensaio com glutathione, conduzido em condições abióticas, o ensaio com H_2DCFA foi conduzido *in vivo* e permite uma quantificação indireta dos níveis intracelulares de EROs antes e após a exposição aos CNCs.

Um volume de 1,9 mL de uma suspensão de *E. coli* a uma concentração de 10^8 CFU/mL foi misturado a 100 μL da suspensão estoque de CNCs (4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em um frasco de vidro, resultando em uma concentração final de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CNCs. Depois de 3 h de incubação sob agitação moderada (60 rpm) a temperatura ambiente, 40 μL de uma solução de H_2DCFA a 10 mM (dissolvida em DMSO) foi adicionada a 2 mL da suspensão bactéria-CNCs, resultando em uma concentração final de H_2DCFA igual a 0,2 mM. As amostras foram incubadas protegidas da luz por 15 min e então 200 μL de cada suspensão foi pipetada em

uma placa de 96 poços. Enzimas intracelulares (esterases) hidrolisam o H₂DCFA no composto não-fluorescente H₂DCF (2',7'-diclorodihidrofluoresceína), que é retido dentro das células. EROs e peroxidases intracelulares catalisam a transformação do H₂DCF no composto DCF (2',7'-diclorofluoresceína). A intensidade de fluorescência emitida pela DCF foi quantificada usando um leitor de microplacas (Cytation 5, Biotek Instruments, EUA) usando um comprimento de onda de excitação de 495 nm. A emissão de fluorescência foi coletada a 527 nm. H₂O₂ foi utilizado como controle positivo para geração de EROs. A intensidade de fluorescência foi normalizada com relação às amostras controles sem os CNCs.

2.3.10 Preparação de vesículas com corante encapsulado

Vesículas lipídicas foram preparadas através de sonicação por ponta (Rieth e Lozano, 2020; Romio *et al.*, 2017). Brevemente, 7,3 mg de DPPC foi adicionado a um frasco de vidro contendo 10 mL de laranja de acridina a 0,25 g/L diluído em solução tampão (HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM). A solução foi vortexada e sonicada por ponta a uma amplitude de 20%, tempo de pulso de 2 s, com intervalos de 5 s para um tempo total de 4 min. Com o objetivo de prevenir o aquecimento excessivo, este ciclo foi realizado 3 vezes com intervalos de 5 min entre cada ciclo. Para remover as partículas de titânio provenientes da ponta e introduzidas pelo processo, a suspensão de vesículas foi transferida para tubos de microcentrífuga de 3 mL e centrifugadas a 1500 rcf por 1 min (Modelo 5425, Eppendorf, Alemanha). O sobrenadante foi introduzido em uma membrana de diálise e dialisada em água ultrapura por 20 h. Com base na quantidade de DPPC utilizada, a concentração de vesículas lipídicas foi estimada em 730 mg/mL. O diâmetro vesicular foi determinado usando um microscópio confocal Zeiss LSM 800, com comprimento de onda de excitação de 488 nm e detecção de 490-700 nm, sob uma lente objetiva de magnificação de 20x. Um total de 40 vesículas foi analisado utilizando o software ImageJ para determinação da distribuição de tamanhos.

2.3.11 Ensaio de extravasamento de corante

A fim de analisar a capacidade dos CNCs de romper bicamadas lipídicas, vesículas contendo corante foram expostas a CNCs em suspensão, conforme realizado em estudos anteriores (Zucker *et al.*, 2017, 2019). Volumes de 75 e 188 µL de uma dispersão estoque de CNCs foram separadamente misturadas com 822 µL de uma solução estoque de vesículas a

uma concentração de 730 mg/mL em um frasco de vidro. As concentrações finais de CNCs nos frascos de vidro foram 200 e 500 µg/mL respectivamente, com um volume total de ensaio de 1,5 mL. Depois de 3 h de exposição a temperatura ambiente, as misturas foram vortexadas por 10 s e centrifugadas a 15,000 rcf por 15 min. O sobrenadante foi coletado e a absorbância (correlacionada à liberação de corante encapsulado) foi medida a 500 nm utilizando um espectrofotômetro (Genesys 30, Thermofisher Scientific, Waltham - MA, EUA). Água deionizada foi utilizada como controle negativo e cada tratamento foi realizado em triplicata. A máxima intensidade de absorbância (Abs_{max}) foi determinada pela solubilização das vesículas lipídicas com 0,1 g/mL de lauril sulfato de sódio (SLS), cujo efeito surfactante resulta na liberação do corante encapsulado na solução. A intensidade média de absorbância de cada condição do ensaio foi dividida pela média da absorbância máxima (Abs_{max}) e os resultados foram expressos como valores normalizados (Lu *et al.*, 2017).

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Propriedades físico-químicas dos nanocristais de celulose

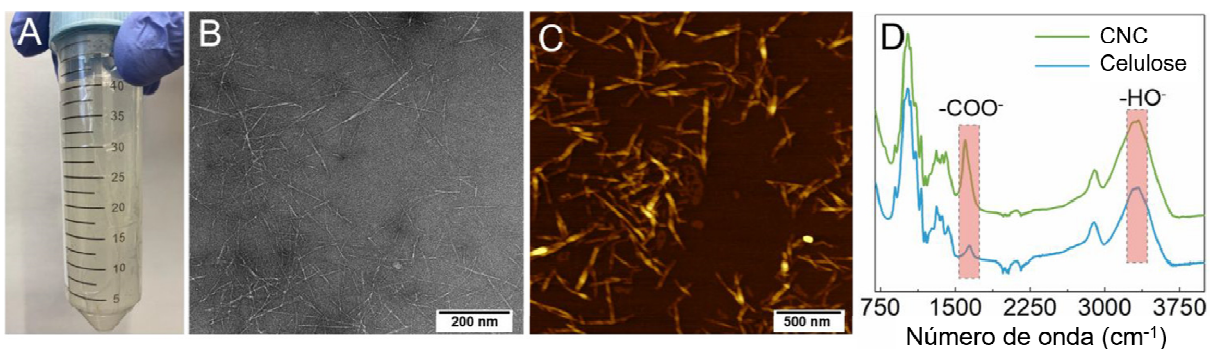
Como um dos componentes majoritários da parede celular vegetal, celulose é um dos biopolímeros mais abundantes no planeta, possuindo inúmeras fontes de obtenção (Isogai, Saito e Fukuzumi, 2011). Este fato torna esse composto altamente atrativo, uma vez que sua obtenção pode ser realizada nas mais variadas cadeias econômicas, incluindo o reprocessamento de resíduos ricos em celulose (Isogai, Saito e Fukuzumi, 2011).

No presente trabalho, capim-elefante, também conhecido como capim-napier ou capim-napier-elefante foi utilizado como matéria-prima para a extração de celulose e preparação de nanocristais de celulose (CNCs). Dois pré-tratamentos hidrotérmicos usando soluções diluídas de H₂SO₄ e NaOH foram utilizadas para remover hemicelulose e lignina, respectivamente, e concentrar celulose na biomassa. Após os pré-tratamentos, a biomassa rica em celulose foi oxidada para aumentar a quantidade de grupos funcionais contendo oxigênio, melhorando a repulsão eletrostática entre as fibras e facilitando a subsequente defibrilação da celulose (Isogai, Saito e Fukuzumi, 2011; Pinto, Bernardes e Rezende, 2019). Por fim, as fibras oxidadas ricas em celulose foram quebradas em nanocristais por sonicação, conforme realizado em trabalhos anteriores (Pinto, Bernardes e Rezende, 2019; Zhou *et al.*, 2018). Em média, o rendimento da conversão em CNCs foi de 65% em massa seca. A Figura 3 ilustra como o capim-elefante foi utilizado como matéria-prima e o procedimento experimental

aplicado para a produção de CNCs.

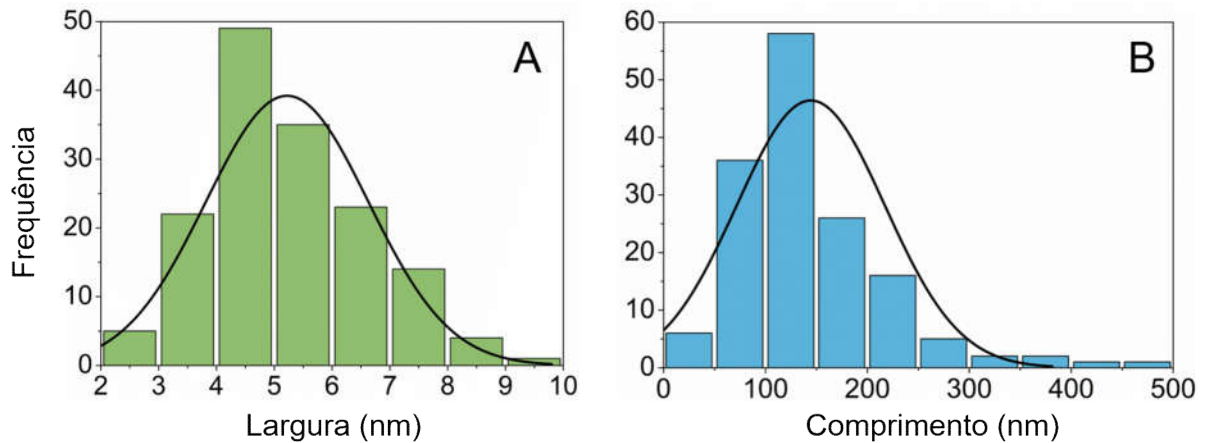
Medições de potencial zeta foram realizadas para avaliar a carga superficial dos CNCs. O nanomaterial apresentou um potencial zeta de -81 ± 8 mV em pH 5, indicando, portanto, uma alta concentração de grupos funcionais negativamente carregados na superfície. O alto número de grupos funcionais contendo oxigênio contribuiu para a excelente estabilidade dos CNCs em água. Uma fotografia da dispersão de CNCs em água (Figura 4A) mostra a aparência homogênea e transparente do líquido, sem a presença visível de agregados. Imagens obtidas por TEM e AFM (Figura 4B e C) mostram a presença de estruturas individualizadas em forma de bastão das partículas de CNC. O software Image J foi utilizado na análise das imagens de TEM e determinação de comprimento e largura média das partículas (Figura 5). A largura média foi de $5,2 \pm 1,4$ nm e o comprimento médio encontrado de 144 ± 73 nm (obtido através da medição de 150 partículas), resultando em uma razão de aspecto (comprimento/largura) de 26 ± 10 . O tamanho dos CNCs obtidos via TEM foi comparável ao tamanho para CNCs obtidos de celulose microcristalina comercial (Zhou *et al.*, 2018), celulose kraft branqueada de fibra longa (Zhou *et al.*, 2018), e bagaço de cana-de-açúcar (Pinto, Bernardes e Rezende, 2019) que foram processados sob condições similares. Por exemplo, CNCs produzidos a partir de celulose microcristalina comercial apresentaram comprimento e largura médio de 185 ± 79 e $4,6 \pm 1,5$ nm, respectivamente.

Figura 4 - (A) Foto da dispersão de CNCs em água. (B) Micrografia obtida por TEM dos CNCs oxidados por TEMPO. (C) Imagem obtida por AFM dos CNCs oxidados por TEMPO. (D) Espectros de FTIR da biomassa rica em celulose e CNCs oxidados por TEMPO.



Adaptado de Noronha *et al.*, 2021.

Figura 5 - Histogramas de distribuição de largura (A) e comprimento (B) de CNCs obtido através de medições via ImageJ.



Adaptado de Noronha *et al.*, 2021.

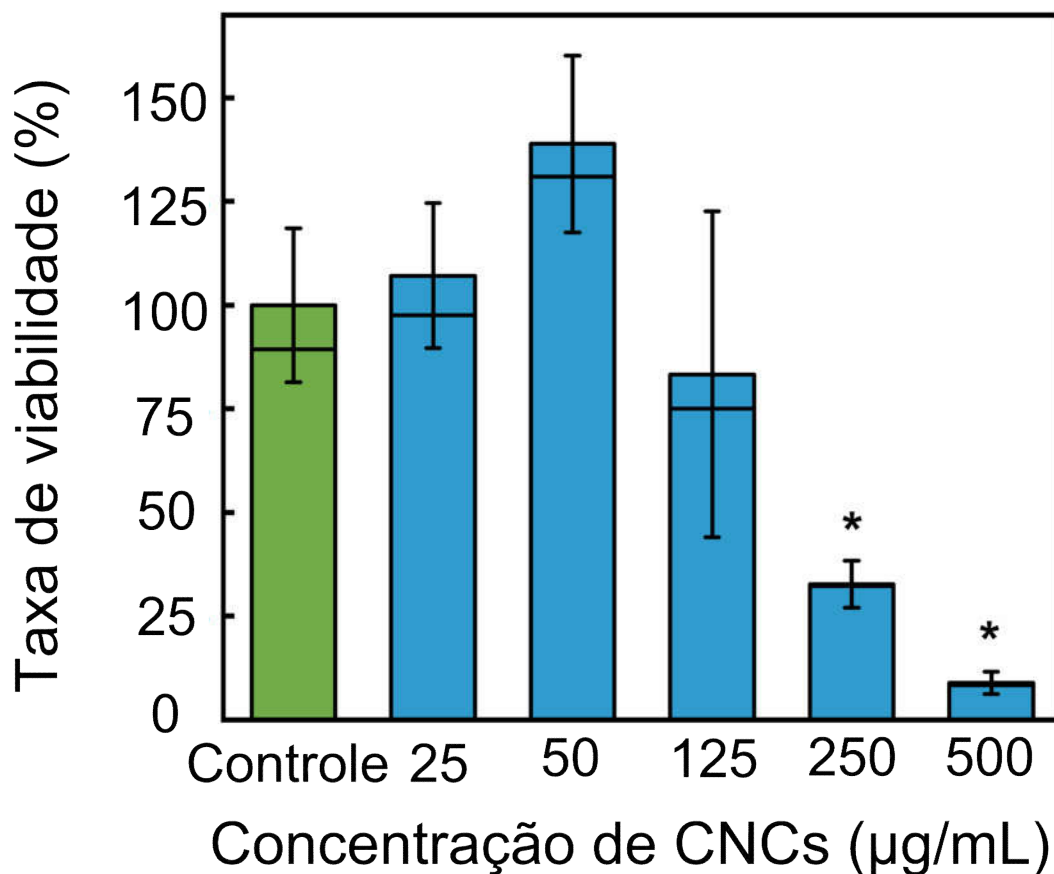
Análises de FTIR foram realizadas para caracterizar os grupos funcionais presentes na biomassa rica em celulose (antes da oxidação) e nos CNCs (Figura 4D). A intensidade da banda estreita de absorção a 1610 cm^{-1} (atribuída a vibração dos grupos carbonila C=O) aumentou após a oxidação da biomassa celulósica pré-tratada (Coseri *et al.*, 2015; Pinto, Bernardes e Rezende, 2019). Esta observação sugere o aumento do número de grupos funcionais carbonila (presentes principalmente em grupos carboxila) após a oxidação. O espectro da amostra de CNCs também mostra bandas de absorção a 1050 cm^{-1} atribuída a vibração de estiramento dos grupos éter (C–O–C) no esqueleto da D-glicose, $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ associado à deformação angular em plano dos grupos hidroxila (O–H), e $\sim 3330\text{ cm}^{-1}$ descrita como estiramento de grupos O–H (Coseri *et al.*, 2015; Espino-Pérez *et al.*, 2014; Hospodarova, Singovszka e Stevulova, 2018). Portanto, os resultados de FTIR mostraram a presença de várias funções químicas oxigenadas na superfície dos CNCs, incluindo hidroxila, ácido carboxílico e éter.

2.4.2 Propriedades antimicrobianas dos nanocristais de celulose em suspensão

Dispersões com diferentes concentrações de CNCs (0, 25, 50, 125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$) foram preparadas para o estudo dose-resposta da toxicidade do nanomaterial, utilizando *E. coli* como bactéria modelo. Como demonstrado na Figura 6, a toxicidade dos CNCs apresentou um padrão de dependência da concentração. Com o aumento da concentração de CNCs, uma inativação significativa das bactérias foi observada, começando a partir de 125

$\mu\text{g/mL}$. A viabilidade de *E. coli* diminuiu de 95% para 9% a uma concentração de CNCs de 500 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de CNCs necessária para inativar 50% das bactérias (IC_{50}) foi de aproximadamente 200 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados indicam que os CNCs em dispersões aquosas foram altamente tóxicos para as células bacterianas sob as condições analisadas.

Figura 6 - Taxa de viabilidade (%) de suspensões de *E. coli* incubadas por 3 h sob diferentes concentrações de CNCs. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao controle em um nível de confiança de 95% ($\alpha=0,05$).



Adaptado de Noronha *et al.*, 2021.

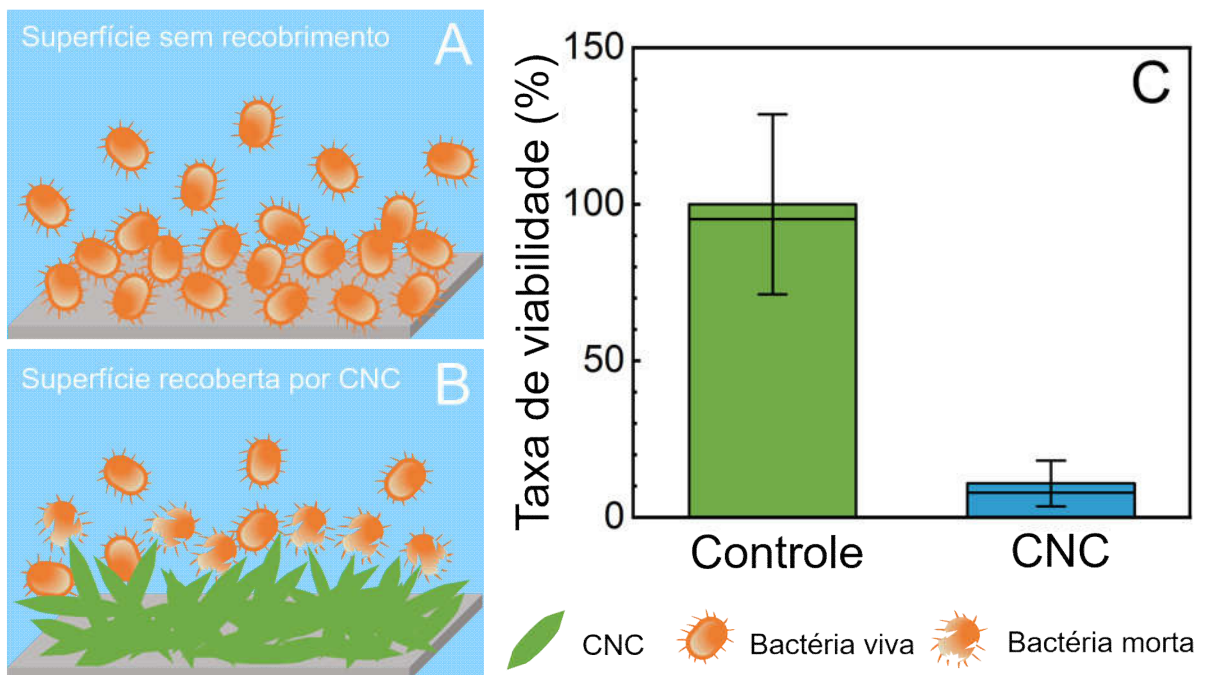
Trabalhos abordando as propriedades antimicrobianas dos CNCs são escassos na literatura. Um estudo anterior investigou a atividade antibacteriana dos CNCs produzidos a partir da hidrólise ácida de polpa de madeira. Os autores observaram uma IC_{50} de aproximadamente 1200 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* 652T7 após 3 h de contato em meio aquoso (Du *et al.*, 2015) – valor aproximadamente seis vezes maior do que o observado neste trabalho. Mudanças na morfologia e propriedades químicas entre as amostras de CNC podem explicar a diferença na toxicidade. Por exemplo, os CNCs descritos no trabalho anterior tiveram comprimento similar, porém uma maior largura (5-20 nm) do que os CNCs apresentados no

presente trabalho ($5,2 \pm 1,4$ nm). Outro fator crítico é a diferença em oxidação entre os materiais. A amostra de CNCs usada no presente estudo foi submetida a oxidação mediada por TEMPO, o que poderia contribuir para a maior toxicidade observada. Materiais à base de celulose oxidados têm demonstrado uma maior atividade antibacteriana do que os materiais sem qualquer modificação (Li *et al.*, 2018). Mou *et al.* relataram que nanofibrilas oxidadas de celulose apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *S. aureus* resistente à metilina (MRSA), enquanto nanofibrilas não oxidadas não mostraram toxicidade (Mou *et al.*, 2017). Os autores atribuíram as propriedades antimicrobianas ao efeito de acidificação promovido pela presença de grupos funcionais aldeídos. Estudos anteriores mostraram toxicidades similares para outros nanomateriais antimicrobianos. Uma redução superior a 90% no número de células viáveis de *Salmonella* foi observado para exposição a nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs) a uma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Yang *et al.*, 2010). Folhas de óxido de grafeno (GO) demonstraram um valor de concentração inibitória mínima (CIM) de 125 $\mu\text{g/mL}$ contra células de *E. coli* (Whitehead *et al.*, 2017). Nanopartículas metálicas, como nanopartículas de prata (AgNPs) (Martínez-Castañón *et al.*, 2008) e ouro (AuNPs) (Shamaila *et al.*, 2016), mostraram valores de CIM significativamente mais baixos que aqueles encontrados para CNCs e nanomateriais à base de carbono. Por exemplo, AgNPs (tamanho médio de 7 nm) apresentaram um valor de CIM de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ contra *E. coli* (Martínez-Castañón *et al.*, 2008). Embora AgNPs possam ter valores muito baixos de CIM e propriedades antimicrobianas excepcionais, há uma necessidade emergente da construção de alternativas de nanomateriais antimicrobianos não-lixiviantes como menos efeitos adversos aos ecossistemas naturais.

2.4.3 Propriedades antimicrobianas de superfícies revestidas por nanocristais de celulose

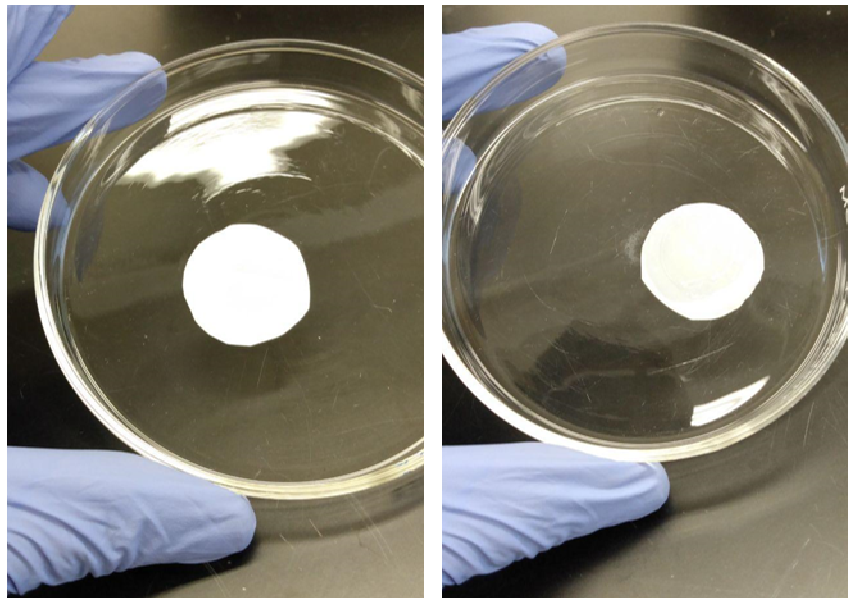
A habilidade dos CNCs de inativarem microrganismos mediante contato como modo de ação foi avaliada utilizando superfícies recobertas por CNCs (Figura 7). Fotografias e imagens de SEM das superfícies não recobertas e recobertas por CNCs são mostradas nas Figura 8 e Figura 9, respectivamente. Embora as fotos não possam mostrar clara diferença no aspecto visual dos filtros (Figura 8), as diferenças morfológicas nas imagens de SEM indicam a deposição bem-sucedida na superfície (Figura 9).

Figura 7 - Representação de células bacterianas interagindo com (A) filtros de PVDF não recobertos (B) e recobertos por CNCs na superfície. (C) Atividade antimicrobiana mediada por contato de superfícies após 3 h de exposição a células de *E. coli*.



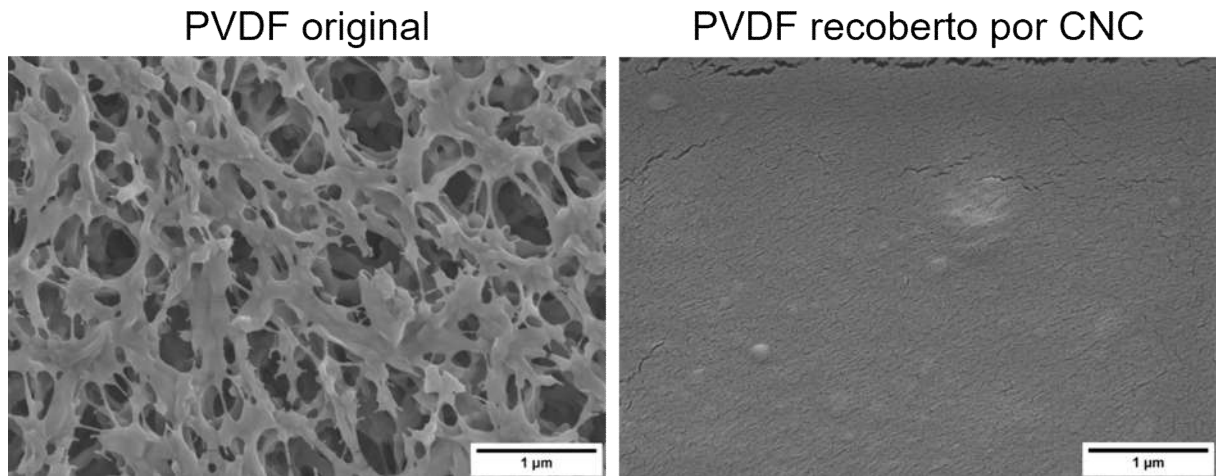
Adaptado de Noronha *et al.*, 2021.

Figura 8 - Fotos das superfícies de PVDF não-recobertas (A) e recobertas por CNCs (B), mostrando cor e aparência.



Adaptado de Noronha *et al.*, 2021.

Figura 9 - Micrografias obtidas por SEM do filtro original de PVDF com tamanho de poro de 0,22 μm (A) e do filtro recoberto com CNCs (B).



Adaptado de Noronha *et al.*, 2021.

Células de *E. coli* foram expostas a superfícies recobertas por CNCs por 3 h, e o número de células viáveis aderidas foi determinado via contagem em placa. Filtros sem a cobertura de CNCs foram utilizados como controle. Depois de 3 h de exposição às superfícies, a viabilidade das células aderidas de *E. coli* foi reduzida em quase 90% em comparação com as amostras de filtro sem recobrimento (Figura 7C). O esquema presente nas Figura 7A e Figura 7B ilustra a inativação bacteriana em decorrência do contato com as superfícies recobertas por CNC. Superfícies de filtro recobertas por SWCNTs rígidos e afilados também foram capazes de inativar células de *E. coli* em porcentagens maiores que 90% (Kang *et al.*, 2008; Kang, S. *et al.*, 2007). Efeitos similares de toxicidade mediada por contato foram encontrados para óxido de grafeno defeituoso (Al-Jumaili *et al.*, 2017; Faria, Perreault e Elimelech, 2018; Perreault *et al.*, 2015). Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que mecanismos mediados por contato (*i.e.*, inativação celular e rompimento da membrana por meio de contato direto das células aderidas e a superfície recoberta) podem ser uma parte essencial da toxicidade dos CNCs a células bacterianas. CNCs poderiam também destruir bactérias através de oxidação dos seus componentes celulares. Mecanismos oxidativos podem ser desencadeados pelos grupos funcionais com alto conteúdo de oxigênio presentes na superfície dos CNCs. Dadas as características químicas e morfológicas dos CNCs, seria de se esperar que ambos os mecanismos (oxidativo e físico) pudessem contribuir para a toxicidade dos CNCs.

O uso de CNCs como recobrimento antimicrobiano apresenta diversas vantagens quando comparado a incorporação de CNCs em compósitos poliméricos – uma das estratégias

mais comuns para produção de materiais à base de CNCs com atividade antimicrobiana. A principal vantagem seria a disponibilidade dos CNCs na porção mais exterior do recobrimento. A deposição de CNCs nas superfícies requer menos nanopartículas, reduzindo os custos e melhorando o contato entre CNCs e bactérias. Nesta situação, não há o aprisionamento de CNCs dentro de uma resina específica ou matriz polimérica, o que poderia resultar em menor exposição das bactérias e menor toxicidade. Além disso, superfícies recobertas por CNCs também podem preservar as características das nanopartículas (*i.e.*, alta área superficial e extremidades pontiagudas), o que é frequentemente ofuscado nos compósitos poliméricos. Portanto, a deposição superficial mostrada neste estudo proporciona um uso mais racional dos CNCs, demonstrando uma forte atividade antibacteriana em virtude do contato direto entre a nanopartícula e as bactérias na superfície. A preservação das características intrínsecas dos CNCs pela deposição superficial é essencial para o desenvolvimento de superfícies ativas que sejam capazes de controlar o processo de incrustação biológica de uma forma eficiente.

2.4.4 Propriedades oxidativas dos nanocristais de celulose

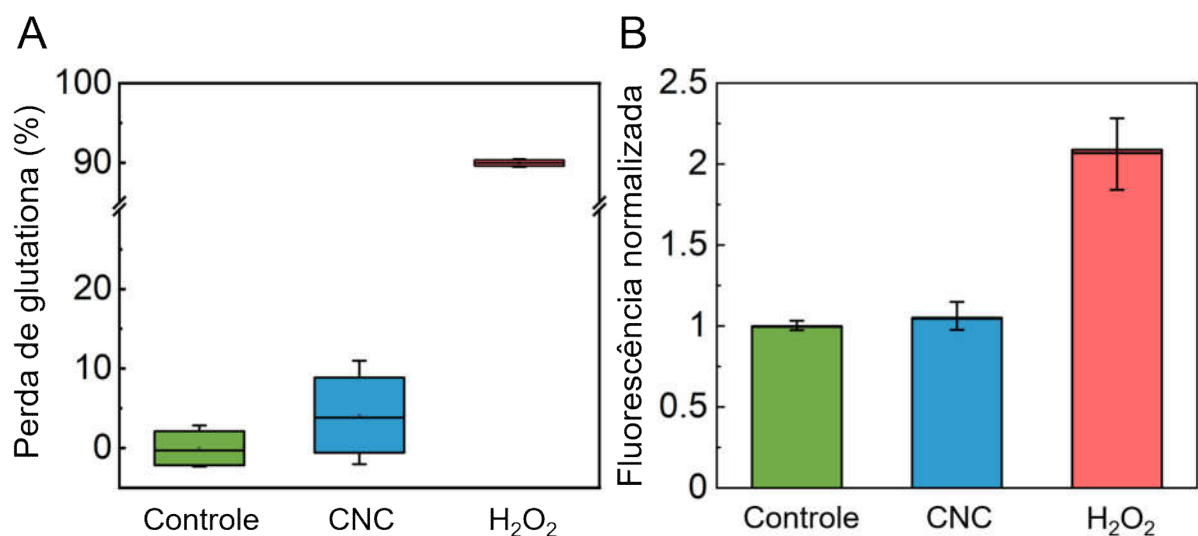
Promover a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) é uma das rotas mais comuns cujo nanomateriais podem inativar microrganismos e outras células. Estes radicais oxidativos podem ser gerados pelas propriedades eletrônicas ou pela interação com o ambiente celular (Hellack *et al.*, 2017; Imlay, 2015; Sharifi *et al.*, 2012). Os testes com glutathione (Barrios *et al.*, 2019; Faria, Perreault e Elimelech, 2018; Perreault *et al.*, 2015) e H₂DCFA (Barrios *et al.*, 2019; Hellack *et al.*, 2017; Imlay, 2015; Sharifi *et al.*, 2012) foram selecionados para investigação do papel do estresse oxidativo no mecanismo de toxicidade dos CNCs. Embora haja pouca informação a respeito das propriedades oxidativas dos CNCs em bactérias, pode-se presumir que, em virtude do alto número de grupos funcionais contendo oxigênio, conforme observado no espectro de FTIR (Figura 4C), este material poderia promover a oxidação celular.

Glutathione em solução foi exposta a 200 µg/mL de CNCs por 3 h a temperatura ambiente. Conforme observado na Figura 10A, CNCs mostraram apenas uma capacidade marginal de indução de oxidação de glutathione. Na presença de CNCs, a oxidação de glutathione aumentou em apenas 5%, quando comparado às amostras controle (sem adição dos nanocristais). Exposição a solução de H₂O₂ 10 mM resultou em 90% de oxidação de glutathione (expresso como perda de glutathione) após 2 h de exposição, validando, dessa forma,

o ensaio. A baixa quantidade de glutathiona oxidada pelos CNCs indicaria uma baixa capacidade de induzir a oxidação química nas condições testadas. Para efeitos comparativos, estudos anteriores relataram cerca de 23 e 90% de oxidação de glutathiona promovidos por óxido de grafeno (Barrios *et al.*, 2019) e nanotubos de carbono de multi-paredes (Pasquini *et al.*, 2013), respectivamente, sob condições de ensaio similares.

A Figura 10B mostra que não houve diferença significativa nas intensidades de fluorescência entre o grupo controle (bactéria sem CNCs) e o tratamento CNC. A intensidade de fluorescência para bactérias expostas ao H_2O_2 (um conhecido agente oxidativo) foi duas vezes maior que aquela observada para bactérias no grupo controle e tratadas com CNCs, validando os resultados do teste com H_2DCFA . Estes resultados indicam que a exposição a CNC não induziu significativamente a produção de EROs dentro das bactérias. Analisados de forma combinada, os testes com H_2DCFA e glutathiona sugerem que os CNCs não causaram um estresse oxidativo via produção de EROs. Portanto, pode-se constatar que o estresse oxidativo possui um papel mínimo ou inexistente na atividade antimicrobiana dos CNCs sob as condições experimentais utilizadas no presente estudo. Embora estes métodos indiretos não demonstrem evidência da geração de EROs, estudos posteriores com foco na detecção de EROs utilizando sondas químicas específicas são necessários para aumentar o entendimento da influência do estresse oxidativo no modo de ação dos CNCs.

Figura 10 - (A) Oxidação de glutathiona por CNC após 3 h de interação. (B) Ensaio de quantificação de EROs por fluorescência de bactérias expostas a CNC e H_2O_2 .



Adaptado de Noronha *et al.*, 2021.

Uma dúvida natural a ser levantada é o porquê do CNC utilizado neste estudo não apresentar toxicidade mediada por estresse oxidativo mesmo com a presença de grupos funcionais contendo oxigênio em sua superfície. Nanomateriais contendo oxigênio, tais como óxido de grafeno (GO) e nanotubos de carbono (CNT), tem demonstrado capacidade de inativação de bactérias através do estresse oxidativo, embora ainda não haja um consenso se o estresse oxidativo mediado por GO é causado pela produção indireta de EROs ou pela troca direta de elétrons (Al-Jumaili *et al.*, 2017; Barrios *et al.*, 2019). Liu *et al.* propuseram que os sítios defeituosos na estrutura de nanomateriais carbonáceos poderiam resultar na oxidação da glutathione (Liu, X. *et al.*, 2011). Estes defeitos na estrutura eletrônica permitiriam a adsorção do oxigênio (O_2) e formação temporária de óxidos ligados a superfície. Estes óxidos, por sua vez, catalisariam a oxidação da glutathione e as espécies reativas de oxigênio provenientes dessa reação seriam liberadas na água. Portanto, os defeitos na estrutura eletrônica e aromática de nanomateriais de carbono estão fundamentalmente envolvidos no processo da depleção da glutathione, o que deixaria as células microbianas vulneráveis à oxidação. Entretanto, esta estrutura química defectiva particularmente presente em nanomateriais carbonáceos está ausente nos CNCs, o que poderia explicar o motivo da sua incapacidade de geração de EROs e oxidação de glutathione.

Adicionalmente, estudos anteriores também demonstraram que o estresse oxidativo mediado por nanomateriais carbonáceos pode ser atribuído a suas propriedades eletrônicas (Liu, H. *et al.*, 2011; Vecitis *et al.*, 2010). Em virtude de sua rede condutiva de elétrons π , nanomateriais a base de carbono sp^2 podem promover o estresse oxidativo através da transferência direta de elétrons livres (Liu, S. *et al.*, 2011). Dada a falta de elétrons π -conjugados e de estrutura química condutiva dos CNCs, a oxidação de glutathione através da troca de elétrons parece improvável. Portanto, pode-se supor que os CNCs foram incapazes de produzir estresse oxidativo seja por oxidação de glutathione (mediada por EROs ou oxidação pela transferência de elétrons) ou pela promoção da produção e acumulação de EROs na célula bacteriana (teste com H_2DCFA). Com base nos resultados desses dois ensaios, pode-se concluir que o estresse oxidativo não tem impacto significativo nas propriedades antibacterianas dos CNCs.

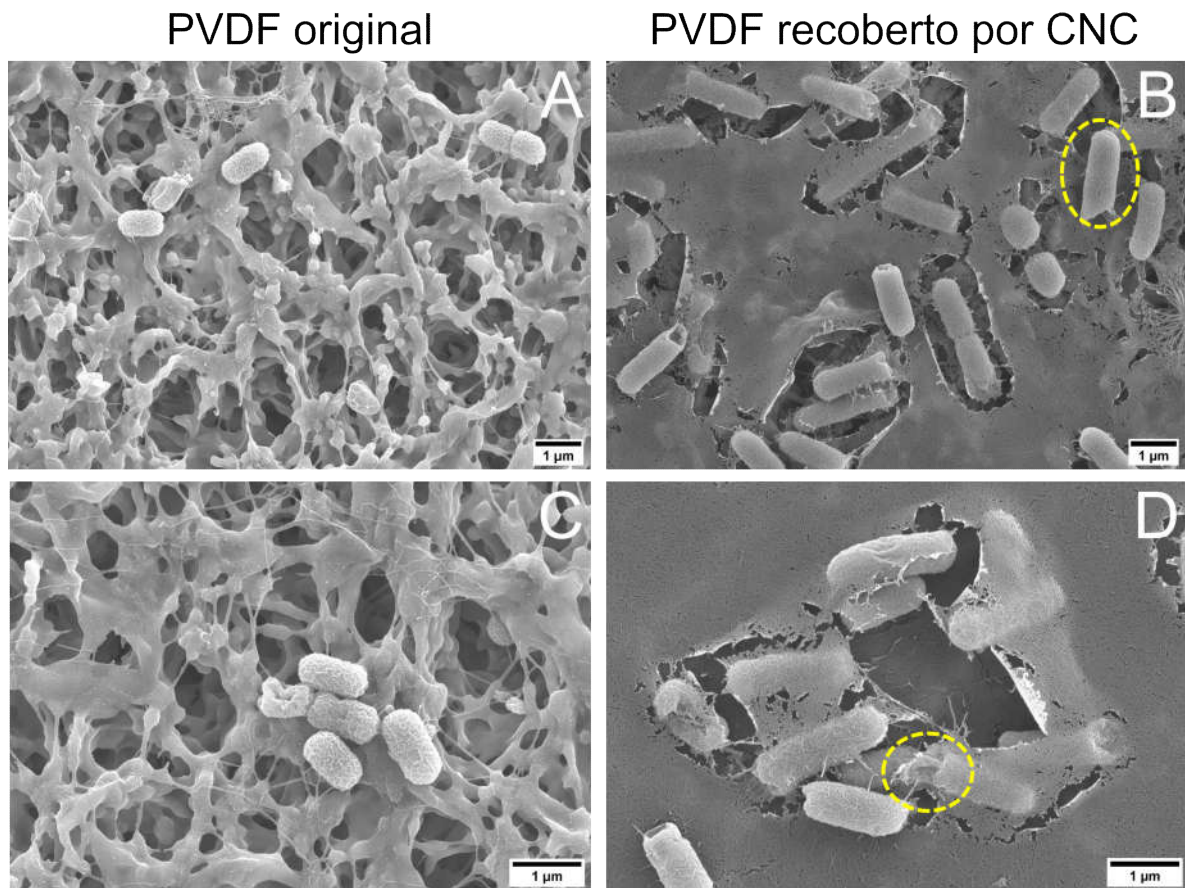
2.4.5 Mecanismos de estresse físico mediados por nanocristais de celulose

Uma vez que o estresse oxidativo não mostrou ter impactos significativos na

toxicidade dos CNCs, foi estabelecida a hipótese que a inativação celular por CNCs pode ser mediada por estresse físico devido à interação da membrana celular com suas extremidades pontiagudas. Imagens de SEM foram utilizadas para verificar danos morfológicos a membrana celular resultante do contato direto das bactérias com a superfície recoberta por CNCs. Além disso, vesículas fosfolipídicas também foram utilizadas para mimetizar bicamadas lipídicas das membranas celulares e determinar se CNCs podem colapsar membranas celulares. O dano à membrana celular potencialmente induzido pelos CNCs pode ser relacionado à extensão do lixiviamento do conteúdo das vesículas fosfolipídicas.

Imagens de microscopia eletrônica de varredura para células de *E. coli* aderidas sobre superfícies de filtro de PDVF não recobertas e recobertas por CNCs foram analisadas. As células de *E. coli* foram expostas a superfícies recobertas e não recobertas por CNCs durante 3 h, seguido de processo de fixação e desidratação antes da aquisição das imagens. Comparado às células aderidas a superfícies não-recobertas, as bactérias aderidas ao filtro recoberto por CNCs mostraram uma perda visível de integridade morfológica (Figura 11). Danos às membranas celulares de bactérias aderidas ao filtro recoberto por CNCs são indicados por círculos amarelos (Figura 11B e Figura 11D). Nestas regiões, estruturas celulares comprometidas e deformadas podem ser observadas. Esta perda na integridade da membrana é provavelmente causada pela interação direta da membrana celular com as estruturas pontiagudas das extremidades dos CNCs. Resultados similares foram relatados para nanotubos de carbono, que podem perfurar a membrana e inativar células através do estresse físico da membrana. Células de *E. coli* expostas a SWCNTs mostraram uma perda significativa de integridade celular, apresentando um padrão achatado em observações por SEM (Kang *et al.*, 2008; Kang, S. *et al.*, 2007). Além disso, o efluxo de ácidos nucleicos provenientes do citosol bacteriano pode ser observado para *E. coli* incubadas com SWCNTs. Análises transcriptômicas também mostraram um aumento na expressão de genes relacionados à respostas a danos celulares (Kang *et al.*, 2008).

Figura 11 - Micrografias obtidas por SEM das células de *E. coli* após 3 h de contato com a superfície original dos filtros de PVDF 0,22 μm (A e C) e dos filtros recobertos por CNCs (B e D).

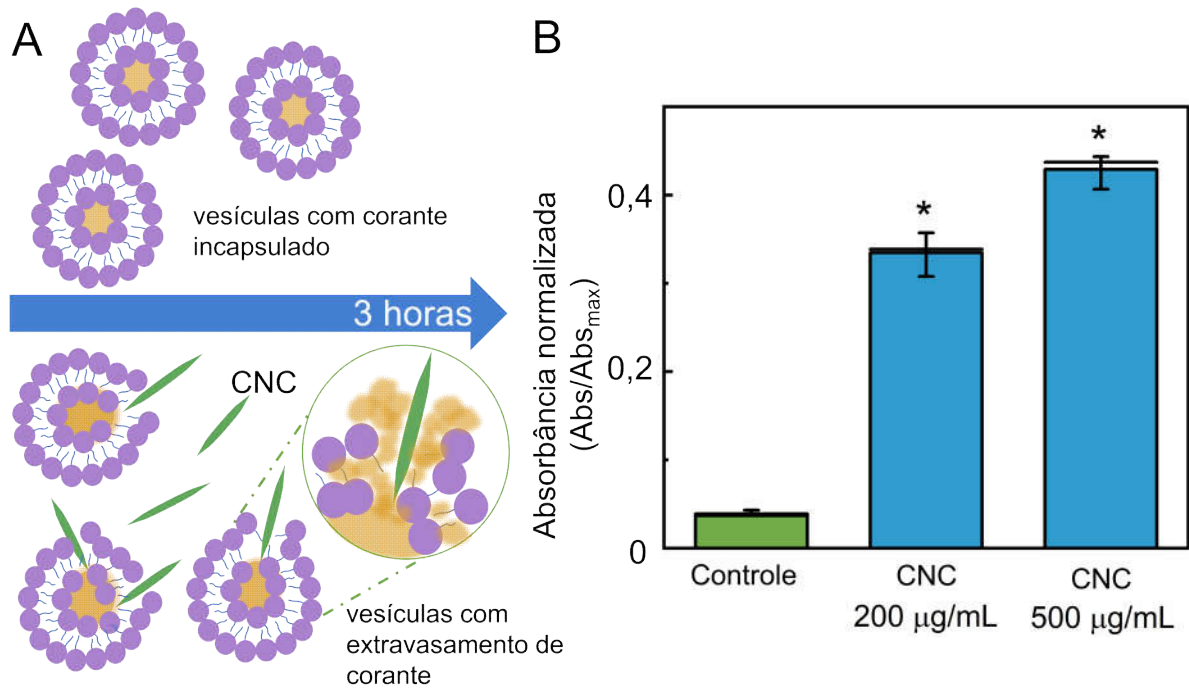


Adaptado de Noronha *et al.*, 2021.

Os resultados do presente estudo indicam que as propriedades antimicrobianas dos CNCs são governadas por interações físicas entre os nanocristais e a superfície exterior das bactérias. O componente principal das membranas celulares é a bicamada fosfolipídica, que protege as células de danos e funciona como uma barreira para a troca de íons, gases e nutrientes. Em contato com os CNCs, um rompimento dessa bicamada pode ocorrer por meio de mecanismos mediados por contato, sendo o mecanismo primário responsável pela inativação bacteriana. A fim de investigar a interação CNCs-células, destruição da bicamada lipídica e liberação de conteúdo citossólico, vesículas fosfolipídicas contendo corante encapsulado foram utilizados para mimetizar a membrana celular exterior (Figura 12A e Figura 13). O ensaio com vesículas lipídicas substância a perda de integridade membranar apresentada nas imagens de SEM e demonstra quantitativamente o rompimento da membrana celular pelos CNCs. Embora as vesículas lipídicas não sejam modelos ideais para representar membranas de células procarióticas devido a simplicidade da composição de sua bicamada

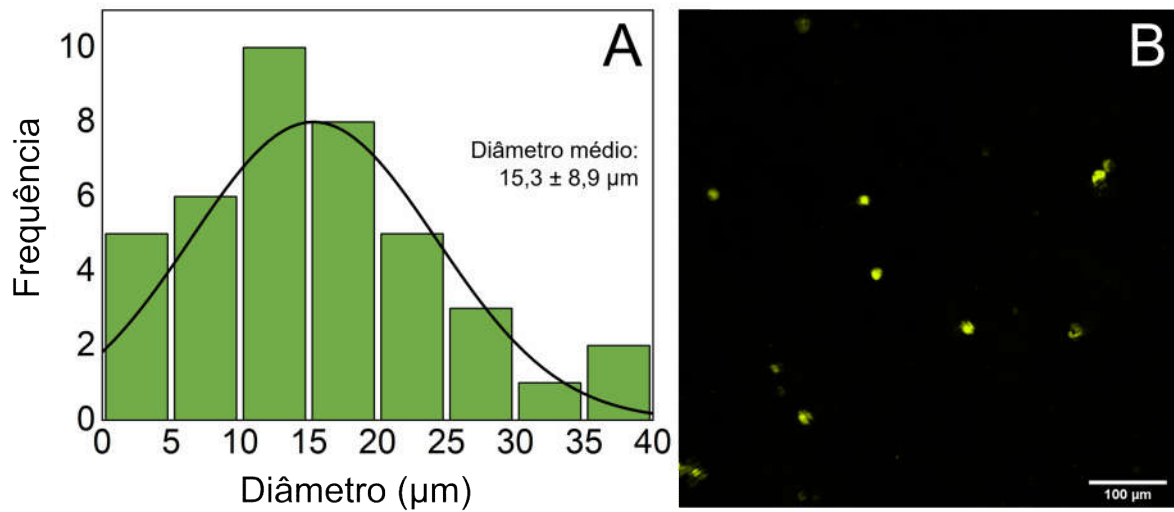
lipídica, essas estruturas ainda podem oferecer informação mecânica valiosa sobre a interação célula-CNC (Cheng *et al.*, 2019). Vesículas unilamelares de fosfocolina com laranja de acridina encapsulado foram postas a interagir com suspensões de CNCs a 200 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 3h. O vazamento de laranja de acridina em solução foi medido através de absorvância óptica e correlacionado ao dano infligido por CNCs às membranas celulares (Lu *et al.*, 2017; Zucker *et al.*, 2017).

Figura 12 - (A) Representação esquemática da interação entre CNC e vesículas lipídicas. (B) Absorvância relativa a 500 nm de suspensões de vesículas lipídicas após interagirem com CNC a 200 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e sem qualquer interação com os nanocristais (controle).



Adaptado de Noronha *et al.*, 2021.

Figura 13 - (A) Histograma de distribuição do diâmetro das vesículas de laranja de acridina/DPPC obtido através de medidas via ImageJ. (B) Exemplo de imagem usada para medições do diâmetro das vesículas.



Adaptado de Noronha *et al.*, 2021.

A Figura 12B mostra a absorvância relativa após 3 h de interação entre vesículas e CNCs. A absorvância relativa é calculada através da divisão da absorvância de cada condição no ensaio pela absorvância total após as vesículas serem rompidas por um surfactante. As amostras controle (vesículas lipídicas em água deionizada) não mostraram qualquer aumento na absorvância relativa, indicando que o efluxo de corante pela bicamada fosfolipídica ao longo de 3 h de experimento foi mínimo. Por outro lado, valores mais altos de absorvância foram observados para vesículas tratadas com suspensões de CNCs, o que demonstra a habilidade dos CNCs de interagirem e induzirem danos físicos à estrutura vesicular. As porcentagens de corante extravasado para a solução após 3 h de interação foram $33 \pm 2,5$ e 43 ± 2 % maiores que o controle para concentrações de CNCs de 200 e 500 µg/mL, respectivamente, sugerindo que os CNCs podem induzir toxicidade através do rompimento de membrana e vazamento dos conteúdos do citosol. Uma vez que o rompimento das vesículas via peroxidação dos lipídios é um mecanismo improvável, os resultados mostraram uma indicação que a destruição das vesículas é causada pelo processo físico mediado por contato entre a estrutura bicamada da vesícula e a estrutura cristalina em formato pontiagudo dos CNCs, como ilustrado na Figura 12A.

Na literatura, não constam estudos anteriores correlacionando a toxicidade microbiana de CNCs e seu mecanismo de ação. Um estudo previamente publicado, entretanto,

demonstrou que a captação celular e citotoxicidade dos CNCs são afetadas por sua carga superficial (Mahmoud *et al.*, 2010). CNCs carregados positivamente puderam ser internalizados por células humanas embrionárias de rim (HEK), sem danificar a integridade da membrana celular ou resultar em toxicidade às células. Inversamente, CNCs negativamente carregados foram incapazes de ser internalizados, embora uma taxa de inativação de 71% contra células HEK em suspensão tenha sido observada. Ainda que não tenha demonstrado capacidade de internalização frente ao modelo celular utilizado, a citotoxicidade dos CNCs negativamente carregado parece ter sido atribuída ao contato direto com a membrana celular. De fato, células HEK rompidas e mortas foram encontradas circundadas por nanocristais negativamente carregados. Este resultado corrobora com a conclusão do presente trabalho de que o mecanismo mediado por contato tem papel essencial na inativação celular. Essa toxicidade mediada por estresse membranar é possível devido à alta razão de aspecto e morfologia pontiaguda dos CNCs

Embora Mahmoud *et al.* tenha observado que CNCs negativamente carregados apresentaram toxicidade à células eucarióticas, mais estudos nesse sentido são necessários, uma vez que os mecanismos de toxicidade para células eucarióticas e procarióticas podem diferir (Mahmoud *et al.*, 2010).

2.5 Conclusão

Os experimentos com CNCs dispersos e superfícies recobertas pelo nanomaterial indicam a citotoxicidade dos nanocristais a células bacterianas. É provável que as superfícies recobertas por CNCs possibilitem um aumento da exposição das extremidades pontiagudas dos CNCs às bactérias, o que poderia causar diretamente a inativação sob mecanismos mediados por contato. Portanto, estes resultados indicam que o contato entre CNCs e bactérias tem papel significativo nos mecanismos de toxicidade. Além disso, os ensaios de oxidação de glutationa e H₂DCFA indicam que os CNCs poderiam não induzir estresse oxidativo de forma significativa nas células. Estes resultados indicam que o estresse oxidativo através da geração de EROs não contribuiria de forma significativa para o mecanismo de toxicidade. Dado que CNCs foram capazes de romper a integridade da bicamada lipídica vesicular, pode-se inferir que este nanomaterial é capaz de penetrar nas células e infligir dano irreversível às membranas. Estes resultados combinados sugerem que os processos mediados quimicamente, tais como a oxidação, não tem impacto significativo na atividade antibacteriana dos CNCs nas

condições experimentais testadas. Portanto, a toxicidade dos CNCs depende estritamente do estresse físico à membrana induzido pelo contato celular com suas estruturas pontiagudas. A avaliação quantitativa do extravasamento de corante das vesículas confirma a habilidade dos CNCs de perfurar a membrana celular, o que poderia causar perda de conteúdo intracelular, como DNA e organelas.

3 CAPÍTULO II: APLICAÇÃO DE REVESTIMENTO DE CNCs COMO AGENTE ANTI-INCRUSTAÇÃO BIOLÓGICA EM MEMBRANAS DE FILTRAÇÃO

3.1 Introdução

Aplicações tecnológicas de membranas de compósitos de filmes finos (*thin-film composite*, TFC), o padrão-ouro para dessalinização, têm sido utilizadas para melhoria dos problemas de escassez de água em diversas partes do mundo (Alvez *et al.*, 2020; Elimelech, 2006; Garg e Joshi, 2015; Hochstrat *et al.*, 2010; Manju e Sagar, 2017; Tang *et al.*, 2018). Apesar de suas excepcionais propriedades de transporte, as membranas de TFC são susceptíveis ao processo de incrustação biológica, não podendo ser submetidas ao tratamento por cloração, em virtude da sensibilidade da camada ativa de poliamida ao íon cloreto (Antony *et al.*, 2010; Kang, G.-D. *et al.*, 2007; Silva, Da, Tessaro e Wada, 2006). A incrustação biológica é o maior problema presente nos processos de filtração por membrana, provocando uma piora na performance da membrana (reduções na permeabilidade a água e rejeição de sais), aumento do uso de reagentes químicos para a limpeza das membranas, maiores custos operacionais e diminuição na vida útil das membranas (Baker e Dudley, 1998; Chen *et al.*, 2004; Davies, 2003; Dreszer *et al.*, 2013; Flemming *et al.*, 1997; Herzberg e Elimelech, 2007). Até agora, ainda não há um método efetivo na remoção de biofilmes, sugerindo que as estratégias de controle de biofilme devem enfatizar tecnologias que inibam a adesão bacteriana ou inativação da bactéria aderida por contato.

A modificação de superfícies de membranas com nanomateriais com o objetivo de mitigar a adesão bacteriana e/ou inativar as bactérias têm sido extensivamente estudada para o controle da formação de biofilmes (Goh *et al.*, 2019; Ogunsona *et al.*, 2020; Ong *et al.*, 2016). Entretanto, aspectos ambientais e de sustentabilidade não são frequentemente considerados na seleção de materiais para modificação de membranas. Alguns materiais, tais como nanomateriais baseados em grafeno, apresentam grandes dificuldades em seu processamento e requerem o uso de compostos químicos tóxicos (Dreyer *et al.*, 2010). Os nanotubos de carbono de camada simples (*single-walled carbon nanotubes*, SWCNT), extensivamente utilizados em recobrimentos antimicrobianos (Eckelman *et al.*, 2012; Pasquini *et al.*, 2012; Tiraferri, D. Vecitis e Elimelech, 2011), têm sido descritos como tóxicos aos seres humanos e ao meio ambiente (Eckelman *et al.*, 2012; Lam, 2003; Zhao e Liu, 2012). Por fim, as nanopartículas de prata, que tem sido amplamente estudadas na redução de bioincrustações

em membranas, também tem enfrentado preocupações ambientais e de saúde no que diz respeito à lixiviação e à necessidade de regeneração após certo tempo (Colman *et al.*, 2014; Liu, Faria, *et al.*, 2017; Santos, dos *et al.*, 2014; Yu, Yin e Liu, 2013).

Recentemente, nanopartículas de celulose tem sido estudadas para uma miríade de usos, incluindo aplicações médicas, tecnologia de tratamento de água e nanocompósitos (Abitbol *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018; Voisin *et al.*, 2017), por conta de suas propriedades físicas e biológicas e sua química de superfície (Nascimento e Rezende, 2018). Nanomateriais à base de celulose trazem a possibilidade de uma alternativa mais sustentável para diversas aplicações ambientais, uma vez que podem ser facilmente obtidas através do processamento de matérias primas renováveis em meio aquoso e possuem química de superfície facilmente ajustável. Nanocristais de celulose são também hidrofílicos, quimicamente inertes, altamente cristalinos, pouco lixiviáveis e com grande área de superfície (Voisin *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017), os tornando um nanomaterial promissor para a redução da incrustação biológica em membranas.

3.2 Objetivos

- Preparação de membranas de TFC funcionalizadas com CNCs.
- Caracterização físico-química de membranas funcionalizadas com CNCs por reação de reticulação via ligação amida através de técnicas de espectroscopia e microscopia.
- Avaliação de propriedades antimicrobianas das membranas utilizando *Escherichia coli* como bactéria modelo.
- Avaliação de propriedades intrínsecas de transporte das membranas de TFC funcionalizadas com CNCs em sistema de osmose reversa por *crossflow*.

3.3 Materiais e métodos

3.3.1 Materiais e reagentes

Hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, 99%), N-hidróxisuccinimida (NHS, 98%), ácido 2-morfolin-4-iletanesulfônico (MES, 99%), ácido 2-[4-(2-hidróxi-1-iletan-1-il)etanesulfônico (HEPES, 99,5%), etilenodiamina (ED,

BioXtra), e (2,2,6,6-Tetrametilpiperidin-1-il)oxil (TEMPO, 98%) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis – MO, EUA). Cloreto de sódio, caldo Luria Bertani (LB), ágar em pó, fosfato de sódio dibásico (anidro), fosfato de sódio monobásico (anidro, 99%), e etanol absoluto foram obtidos da Fisher Scientific (Atlanta – GA, EUA). Glutaraldeído (50% solução aquosa, grau microscopia eletrônica), paraformaldeído (16% solução aquosa, grau microscopia eletrônica), e hexametildisilazano (97%) foram obtidos da Electron Microscopy Sciences (Hatfield – PA, EUA). Ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 98%), hidróxido de sódio (NaOH), brometo de sódio (NaBr) e hipoclorito de sódio (NaClO, 10-12%) foram obtidos da Synth (Diadema, São Paulo, Brasil). Água deionizada com uma resistência de 18.2 M Ω ·cm foi obtida de um sistema de purificação Milli-Q® Direct Water (EMD Millipore, Burlington – MA, EUA). O capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) foi gentilmente cedido pelo Instituto de Zootecnia (Nova Odessa, São Paulo, Brasil). A biomassa vegetal foi colhida doze meses após o plantio. As folhas foram separadas, secas em estufa de convecção (Tecnal TE-394/3, Piracicaba, Brasil) a 60 °C por 24 h e moídas em moinho de facas através de uma peneira de 10 mesh (moedor SOLAB – SL 31, Piracicaba, Brasil). Ao final, a biomassa moída foi armazenada em sacos plásticos de polipropileno.

3.3.2 *Preparação dos nanocristais de celulose*

Preparo realizado conforme metodologia descrita no capítulo I, seção 2.3.2.

3.3.3 *Caracterização dos nanocristais de celulose*

Características estruturais dos nanocristais de celulose secos e da biomassa pré-tratada (rica em fibras de celulose) foram analisadas através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (Fourier transformed infrared spectroscopy, FTIR) em um equipamento Agilent Cary 630, operando no modo de reflexão total atenuada (*attenuated total reflection*, ATR). Medições de potencial zeta para determinar a carga superficial dos nanocristais em água foram realizadas em um Malvern Zetasizer 300HS. As características morfológicas dos CNCs foram analisadas através de microscopia eletrônica de transmissão (*transmission electron microscopy*, TEM) utilizando um microscópio Carl Zeiss LIBRA 120. Uma alíquota da dispersão de CNCs (10 μ g/mL) foi depositada sob grade de cobre de 400 mesh com filme de carbono, marcada com acetato de uranila (2%, v/v) e então seca em um dessecador por 2 h a temperatura ambiente previamente a análise. As imagens de TEM foram

analisadas com o auxílio do software Image J para determinação da largura e comprimento médio dos CNCs.

3.3.4 Funcionalização das membranas de compósitos de filme fino (TFC) com nanocristais de celulose

As membranas de compósitos de filme fino (TFC) de poliamida foram funcionalizadas com CNCs através de um método de reticulação bem estabelecido, utilizando EDC e NHS (Fischer, 2010; Perreault, Tousley e Elimelech, 2014; Tiraferri, D. Vecitis e Elimelech, 2011). As membranas foram dispostas sobre uma placa de vidro e cobertas com uma moldura composta de borracha e polietileno de alta densidade, deixando apenas a camada ativa exposta. Durante a funcionalização, as molduras foram presas a fim de evitar qualquer vazamento e dispostas sobre um agitador orbital a 60 rpm e temperatura ambiente.

Anteriormente a funcionalização com CNCs, os grupos funcionais de ácido carboxílico na camada ativa da membrana foram submetidos a uma etapa de reticulação com etilenodiamina (ED), a fim de produzir grupos funcionais de amina primária na superfície da membrana. Com essa finalidade, a superfície da membrana contendo os grupos ácido carboxílicos nativos foi exposta à 25 mL de uma solução de EDC 4 mM, NHS 10 mM e NaCl 0,5 M em um tampão MES 10 mM com pH ajustado para 5,2 utilizando soluções de HCl e NaOH. Nesta etapa, estes grupos funcionais nativos são convertidos em ésteres reativos, que prontamente reagem com grupos amina primários. Após 1 hora, a solução foi descartada e a membrana foi lavada duas vezes com água deionizada. Então, a membrana foi exposta a 25 mL de uma solução de ED 10 mM e NaCl 0,15 M em tampão HEPES a pH 7,5 por 30 minutos. ED reage com os ésteres ativos na superfície da membrana, reticulando seus grupos funcionais aminas primárias com os grupos carboxila ativados na camada de poliamida. Após o processo, a solução foi descartada e a membrana foi lavada duas vezes com água deionizada para remoção da etilenodiamina não ligada. Em seguida, 25 mL de uma suspensão de CNCs (1000 µg/mL) foi submetida a banho de ultrassom por 15 minutos e diluída com 20 mL de tampão MES 100 mM (pH 6,2). Em 10 minutos antes da exposição da suspensão às membranas funcionalizadas com ED, 7,2 mg de EDC (0,75 mM) e 7,2 mg de NHS (1,25 mM) foram dissolvidas em 5 mL de tampão MES 100 mM (pH 6,2) e, então, adicionados à suspensão de CNC para conversão dos grupos funcionais ácido carboxílico em ésteres reativos. Após 10 minutos, o pH da suspensão de CNC foi ajustado para 7,2 e cada membrana

foi exposta a 25 mL da suspensão de CNCs por 3 h, para promover a reticulação dos CNCs nas superfícies das membranas via ligação amida. As membranas funcionalizadas com CNCs foram extensivamente enxaguadas com água deionizada e armazenadas a 4 °C até o uso.

3.3.5 Caracterização das membranas de compósito de filme fino originais e funcionalizadas com CNC

A presença de CNCs na superfície da membrana de TFC foi avaliada através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier transformed infrared spectroscopy*, FTIR) em um equipamento Agilent Cary 630, operando no modo de reflexão total atenuada (ATR). Fragmentos retirados das membranas foram mantidos em um dessecador sob vácuo a partir do dia anterior a análise de FTIR. A ligação química dos CNCs à superfície da membrana foi confirmada através de espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS). As membranas foram armazenadas em um dessecador sob vácuo por um dia e então analisadas em um equipamento PHI VersaProbe III Scanning XPS Microprobe (Physical Electronics, Chanhassen, EUA), utilizando uma fonte de raios X monocromáticos Al- $\text{K}\alpha$ ($h\nu = 1486,7$ eV). A profundidade de escape fotoeletrônico foi menor que 10 nm e o ângulo de aquisição dos fotoelétrons foi ajustado para 45°. As análises de XPS foram conduzidas em uma área de 100 μm^2 e os espectros foram obtidos através da média de 5 varreduras.

A presença de C, N e O na membrana de TFC original e na funcionalizada com CNCs foi analisada através da espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS). As amostras foram montadas em suportes de alumínio para microscopia (*stubs*) e recobertas com uma camada de irídio em um equipamento Baltec MED 020 *Sputter Coater* (Balzers, Liechtenstein). A análise de EDS foi realizada utilizando um detector Oxford X–Max 50 *silicon drift* (Oxford Instruments, Reino Unido) integrado em um microscópio eletrônico de varredura Quanta 650 (FEI, Hillsboro, EUA) operando a 3 kV. Baixas voltagens de aceleração possibilitam a caracterização elementar das camadas mais superficiais das amostras.

A morfologia das membranas de TFC originais e funcionalizadas com CNCs foi observada através de microscopia eletrônica de varredura. Pedacos de membrana com cerca de 1 cm^2 foram mantidos em dessecador de um dia para o outro sob temperatura ambiente e, posteriormente, aderidas a suportes de alumínio através de fita condutiva de carbono. As

amostras foram mantidas novamente em dessecador até o dia seguinte para realização do processo de *sputter coating* com ouro-paládio em um *Sputter Coater* Denton Desk V. As superfícies das membranas foram analisadas em um microscópio eletrônico Hitachi SU5000 Schottky operando a uma voltagem de aceleração de 5 kV.

A hidrofiliçidade da superfície das membranas TFC originais e funcionalizadas com CNCs foi determinada utilizando o método da gota séssil com água deionizada. Fragmentos das membranas foram aderidos a lâminas de vidro para microscopia e as medições foram realizadas em um goniômetro Ramé-Hart utilizando o programa DROPIImage. Os resultados são apresentados como uma média de 50 medidas realizadas em localizações randomizadas de 2 fragmentos de membrana diferentes para cada amostra.

A rugosidade de superfície da membrana original de TFC e da funcionalizada com CNCs foi avaliada por microscopia de força atômica (AFM) em um equipamento NanoSurf EasyScan 2 Flex com um controlador NanoSurf C3000. Imagens topográficas foram adquiridas através de modo de contato intermitente (*tapping*) usando uma sonda de silicone Tap300Al-G com revestimento reflexivo de alumínio (raio da ponta < 10 nm, força constante = 40 N m⁻¹ e frequência de ressonância de 300 kHz. Os parâmetros de rugosidade média de área – desvio padrão das alturas entre picos e vales (*root mean square height*, Sq ou rugosidade RMS) e altura aritmética média (*arithmetical mean height*, Sa) – foram calculados através do programa *Gwyddion* em seis diferentes imagens (10 x 10 μm²) adquiridas em regiões selecionadas aleatoriamente de cada fragmento de membrana.

As propriedades intrínsecas de transporte das membranas originais (TFC) e das funcionalizadas com CNCs (CNC-TFC) foram avaliadas em um sistema de bancada de filtração por osmose reversa em *crossflow* e cada experimento foi realizado em triplicata. A área efetiva da membrana foi de 20,02 cm², a velocidade de *crossflow* foi mantida a 21,4 cm/s e a temperatura foi mantida constante a 25 ± 0,5°C. As membranas foram inicialmente compactadas com água deionizada a 450 psi por 24 h até que o fluxo de permeato atingisse um estado estacionário. Para testar a rejeição de NaCl das membranas, uma solução de 5 M foi adicionada ao reservatório de alimentação para que uma concentração final de 50 mM fosse atingida.

A permeabilidade intrínseca a água (*A*) foi determinada utilizando a seguinte equação:

$$A = \frac{J_w}{\Delta P}$$

O fluxo bruto de água J_w foi determinado através da divisão da taxa volumétrica de fluxo do permeato pela área efetiva da membrana. O fluxo bruto de água foi então dividido pela pressão aplicada (ΔP) para gerar a permeabilidade intrínseca a água da membrana. A rejeição observada de NaCl (R) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$R = 1 - \frac{C_p}{C_b}$$

Um condutivímetro calibrado (Oakton Instruments, Vernon Hills, EUA) foi utilizado para determinar a concentração de NaCl da alimentação (C_b) e do permeato (C_p). Os valores de rejeição de NaCl observados para cada amostra são a média de três medições diferentes. O coeficiente de permeabilidade do soluto foi determinado utilizando a seguinte equação:

$$B = J_w^{RO} \frac{1 - R}{R} \exp\left(-\frac{J_w^{RO}}{k}\right)$$

Onde J_w^{RO} é o fluxo de permeato observado, R é a rejeição de sal observada e k é o coeficiente de transferência de massa da célula de fluxo cruzado (Hoek, Kim e Elimelech, 2002; Nimdeo, Joshi e Muralidhar, 2014).

3.3.6 Atividade antimicrobiana das membranas funcionalizadas com nanocristais de celulose

Escherichia coli (American Type Culture Collection – ATCC – 8739) foi cultivada a partir da transferência de uma colônia em placa para um tubo contendo caldo e mantida em uma incubadora a 37°C de um dia para o outro. A cultura foi então diluída (1:25) em caldo LB fresco e mantida sob agitação com barra magnética a 37°C até que a densidade óptica a 600 nm atingisse 1, indicando a fase exponencial (log) de crescimento (cerca de 2 h) (Faria, de *et al.*, 2017; Faria, de, Perreault, Shaulsky, Arias Chavez, Laura H, *et al.*, 2015; Liu, Faria, *et al.*, 2017). As células de bactéria foram lavadas por centrifugação com solução salina (NaCl 0,9%) estéril antes de serem diluídas (1:10) para uma concentração de cerca de 10^8 UFC/mL. Fragmentos de 1,7 cm² foram cortados das membranas originais (TFC) e das funcionalizadas com CNCs (CNC-TFC) e então dispostas em adaptadores de PVC, mantendo a camada ativa da membrana exposta a suspensão bacteriana. Cada fragmento de membrana foi incubado com 5 mL da suspensão bacteriana (3 mL/cm²). Depois de 3 horas, a suspensão bacteriana foi

descartada e as membranas foram cuidadosamente enxaguadas com 5 mL de solução salina (NaCl 0,9%) estéril. Os fragmentos de membrana foram submetidos à sonicação em banho em 10 mL de solução salina por 15 minutos para que as bactérias pudessem ser separadas da superfície das membranas. Um volume de 100 µL de cada suspensão foi utilizado no preparo de diluições seriadas e 100 µL da suspensão bacteriana de cada diluição foi espalhado em placa com ágar LB. Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados em quadruplicata e as placas incubadas de um dia para o outro a 37°C para contagem das colônias.

3.3.7 Características morfológicas das células bacterianas aderidas às membranas

Para avaliação da morfologia das bactérias na superfície das membranas, suspensões de *E. coli* foram preparadas e expostas a superfície da membrana. Após 3 horas de incubação, as membranas foram enxaguadas com solução salina (NaCl 0,9%) e tampão de Sorenson 0,2 M (pH 7,2) para remover células não-aderidas. Após essa etapa de lavagem, as bactérias aderidas foram expostas à uma solução do fixativo de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% diluído em tampão de Sorenson 0,2 M, pH 7,2) por 3 h. A solução de fixativo foi removida e a superfície da membrana foi sequencialmente enxaguada com tampão de Sorenson 0,2 M e água ultrapura. Após a fixação, as células aderidas foram desidratadas utilizando uma série de soluções água/etanol. As membranas foram imersas em cada solução (água/etanol 50:50, 30:70, 20:80, 10:90 e etanol 100%) por 10 minutos, começando da mais diluída até a mais concentrada, finalizando com o etanol absoluto. Em sequência, as membranas foram imersas em hexametildisilazano (HMDS, 97%) por 10 minutos por 2 vezes. Depois das etapas de desidratação, as membranas foram acondicionadas em um dessecador de um dia para o outro sob temperatura ambiente. As amostras foram submetidas a um processo de *sputter-coating* com ouro-paládio em um equipamento Denton Desk V Sputter Coater e as bactérias foram analisadas em um microscópio de varredura eletrônico Hitachi SU5000 Schottky Field-Emission operando a uma voltagem de aceleração de 5 kV.

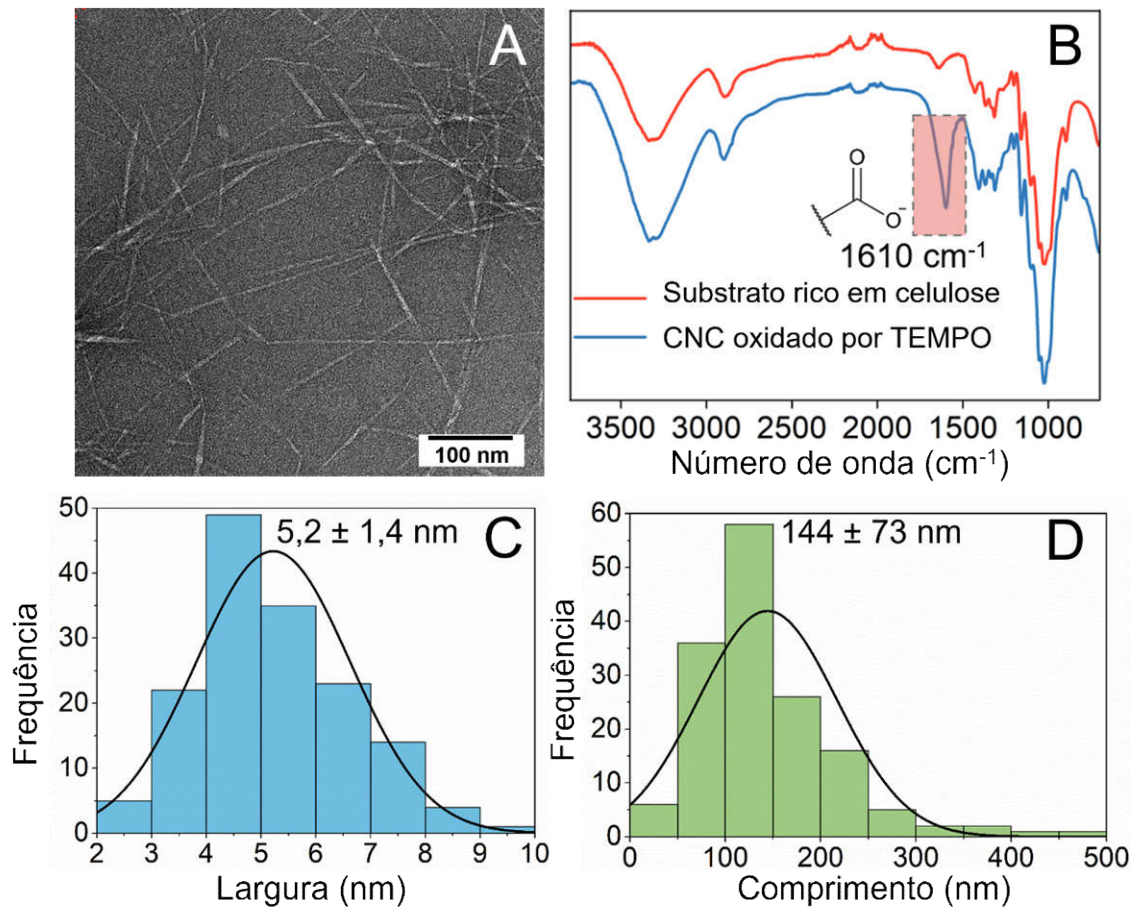
3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Caracterização físico-química dos CNCs

Oxidação mediada por TEMPO foi utilizada para promover a conversão dos grupos hidroxila primários do C6 da celulose em grupamentos carboxilato de sódio (Isogai, Saito e Fukuzumi, 2011). A presença de grupos ácido carboxílico na superfície é necessária para a utilização da reticulação mediada por EDC-NHS na ligação dos CNCs à superfície da membrana. A presença de grupos funcionais ácido carboxílico foi indicada pelos resultados das medições de potencial zeta e confirmada através de análises de FTIR. Após a oxidação e sonicação, CNCs apresentaram -81 ± 8 mV de potencial zeta (pH 5), em concordância com a presença de carga superficial negativa estabilizante. Espectros de FTIR (Figura 14B) mostraram uma banda de absorção a 1610 cm^{-1} , atribuída aos grupos carboxilato presentes na forma de sal sódico (Coseri *et al.*, 2015). A intensidade dessa banda foi significativamente maior no espectro de CNCs oxidados em comparação com a biomassa precursora rica em celulose, indicando, portanto, um aumento no número de grupos carboxilato em decorrência da oxidação.

As características morfológicas dos CNCs foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. As imagens de TEM mostraram uma morfologia baculiforme (Figura 14A), com comprimento e largura apresentando distribuição assimétrica (Figura 14C e Figura 14D). A largura média foi calculada em $5,2 \pm 1,4$ nm, valor consistente com o tamanho do fragmento da seção transversal de fibrilas de celulose elementares (Ding e Himmel, 2006). O comprimento médio foi de 144 ± 73 nm, resultando em uma razão de aspecto (comprimento/largura) de 26 ± 10 . Esses resultados são comparáveis às dimensões obtidas para CNCs produzidos através de condições similares de oxidação e desintegração, mas partindo de matérias-primas diferentes (Abitbol *et al.*, 2016; Pinto, Bernardes e Rezende, 2019; Zhou *et al.*, 2018).

Figura 14 - (A) Micrografia obtida por TEM dos nanocristais de celulose oxidados por TEMPO. (B) Espectro FTIR do substrato rico em celulose e dos CNCs oxidados por TEMPO. Histogramas com distribuição de largura (C) e comprimento (D) dos CNCs.



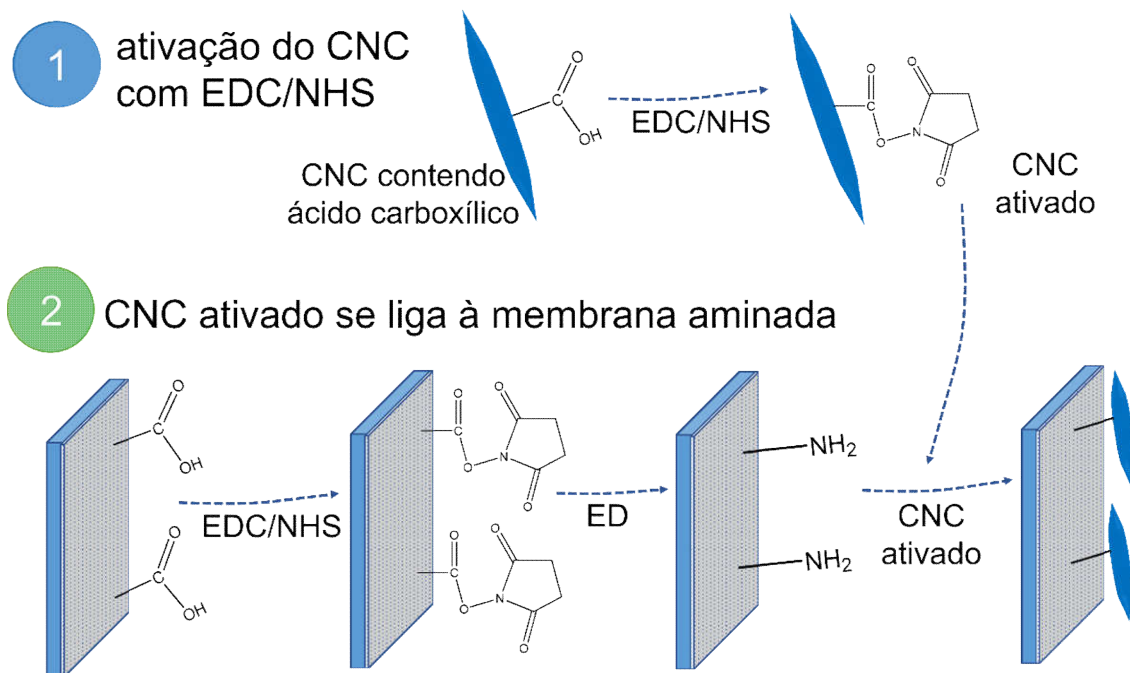
Adaptado de Jackson *et al.*, 2021.

3.4.2 Caracterização das membranas funcionalizadas com CNCs

CNCs foram irreversivelmente ligados a superfície das membranas comerciais de TFC através de *cross-linking* por ligação de amida. Grupos funcionais nativos de ácido carboxílico na superfície da membrana foram ativados com EDC e NHS e convertidos em grupos amina primários através da reação com etilenodiamina (ED). Os grupos amina primários na membrana de TFC modificada com ED foram então ligados por *cross-linking* com os grupos funcionais ácido carboxílico ativados por EDC/NHS presentes na superfície dos CNCs oxidado, formando ligações amida e ligando os nanocristais a superfície da membrana de forma irreversível (Figura 15). Fotografias das membranas modificadas e não modificadas são

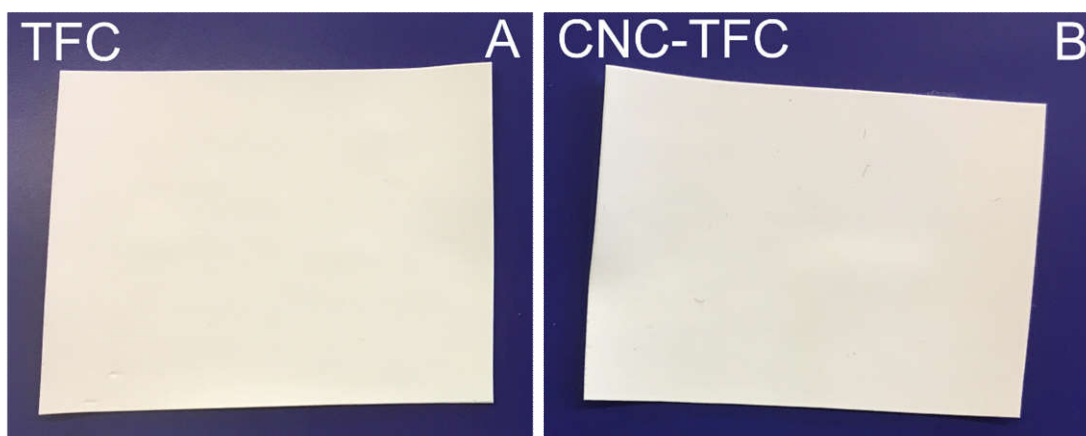
apresentadas na Figura 16, não foram observadas mudanças significativas de coloração nas membranas em decorrência da funcionalização com CNC.

Figura 15 - Esquema de reação para a ligação covalente de CNCs na camada ativa de poliamida das membranas de TFC.



Adaptado de Jackson *et al.*, 2021.

Figura 16 - Imagens da membrana de TFC original (A) e da membrana CNC-TFC (B).

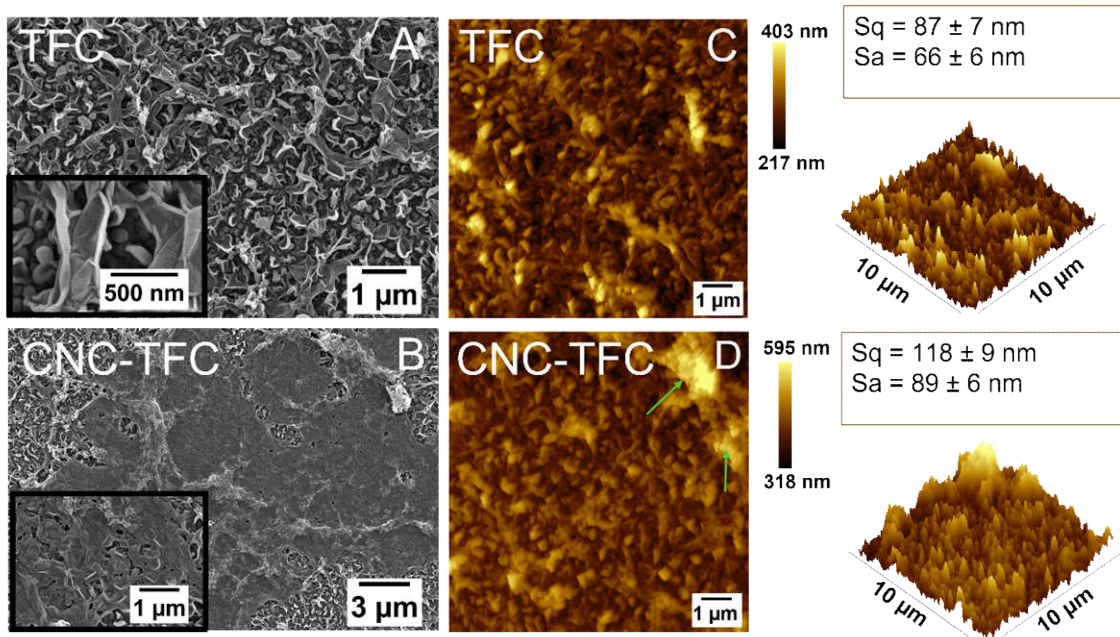


Adaptado de Jackson *et al.*, 2021.

A presença dos CNCs na superfície da membrana foi investigada utilizando SEM, FTIR-ATR e AFM. Micrografias obtidas por SEM das membranas funcionalizadas revelaram que a ligação dos CNCs à superfície das membranas foi bem-sucedida, fato indicado pela camada contínua de material cobrindo a topografia de vales e cumes presente nas membranas originais (Figura 17). O espectro de FTIR (Figura 18) para as membranas originais de TFC e funcionalizadas com CNCs indicou a presença de CNCs na superfície, em virtude do aumento das bandas de absorção a 3420 e 1730 cm^{-1} , associadas aos grupos funcionais hidroxila e carbonila, respectivamente, após a funcionalização. Devido à natureza aleatória da reação de *cross-linking* utilizando EDC e NHS (Hua *et al.*, 2016; Peng *et al.*, 2013), uma distribuição homogênea dos CNCs ao longo da membrana poderia não ser observada, entretanto, as micrografias obtidas por SEM mostraram que grandes porções da membrana foram recobertas por camadas contínuas de CNCs recobrindo a topografia nativa das membranas.

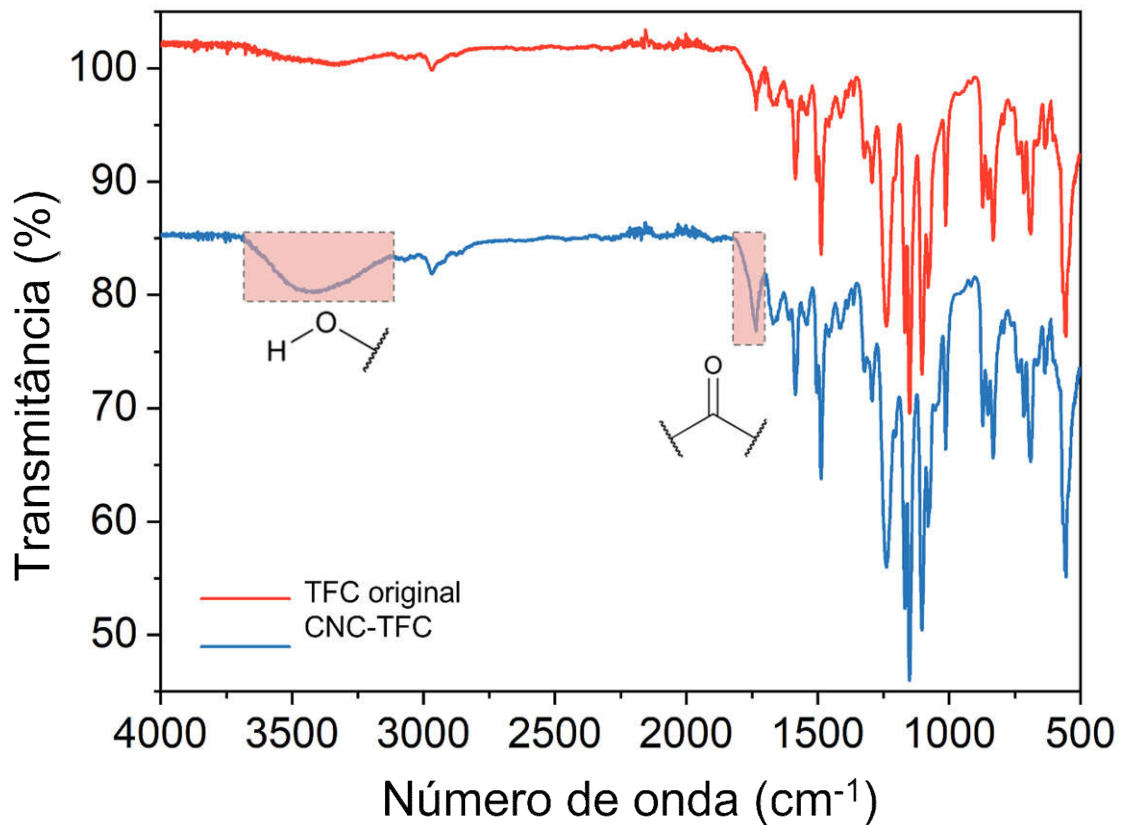
As topografias das membranas de TFC (Figura 17C) e CNC-TFC (Figura 17D) foram analisadas por AFM. A presença de CNCs na camada ativa de poliamida aumentou significativamente a rugosidade da superfície tridimensional da membrana. O desvio padrão das alturas entre picos e vales (*root mean square height*, S_q) foi de 87 ± 7 nm para a membrana original e 118 ± 9 nm para as membranas de CNC-TFC, enquanto a rugosidade média aritmética foi estimada em 66 ± 6 nm para a membrana original e 89 ± 6 nm para as membranas funcionalizadas com CNC. O aumento da rugosidade decorre provavelmente da presença de agregados de CNCs ao longo da superfície da membrana. Resultados similares foram previamente obtidos para membranas de poliétersulfona, cujo processo de incorporação de CNCs também resultou em aumento da rugosidade de superfície (Asempour *et al.*, 2018; Bai *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020).

Figura 17 - Micrografias de SEM da superfície de membranas não modificadas (A) e funcionalizadas com CNCs (B). Mapa de rugosidade AFM (esquerda) 2D e (direita) 3D para superfície das membranas de TFC (C) e CNC-TFC (D). As setas verdes indicam agregados de CNCs.



Adaptado de Jackson *et al.*, 2021.

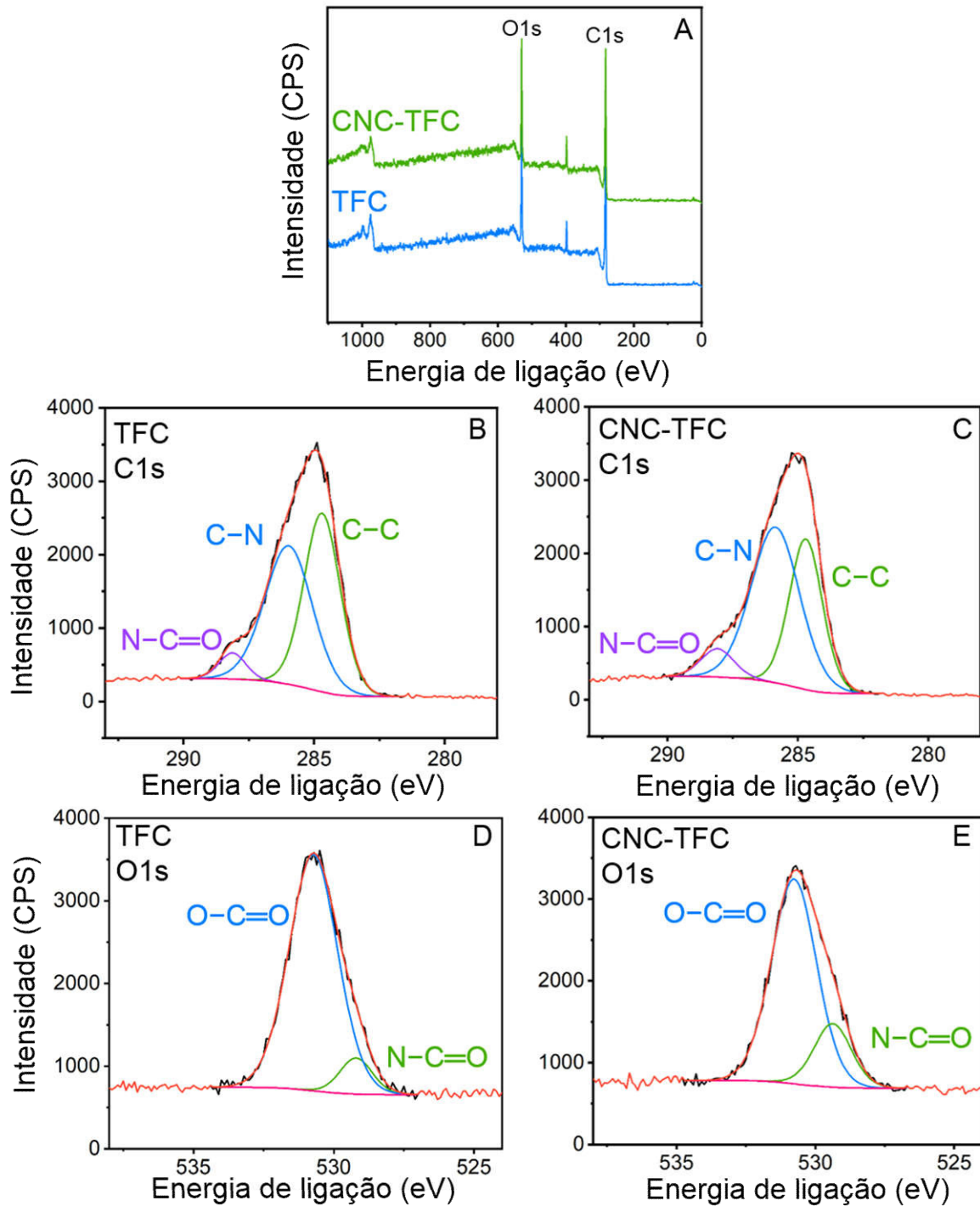
Figura 18 - Espectros obtidos por FTIR das membranas TFC originais e funcionalizadas com CNCs.



Adaptado de Jackson *et al.*, 2021.

A ligação química entre CNCs e a superfície da membrana de TFC foi avaliada através de XPS, os resultados são mostrados na Figura 19 e Tabela 1. Para ambos os tipos de membranas (TFC original e CNC-TFC), o espectro C 1s pode ser deconvoluído em 3 picos componentes. Para a membrana de TFC, os picos observados nas energias de ligação 285,9 e 288,1 eV, atribuídos a ligação N-C e N-C=O, respectivamente, podem ser atribuídos às ligações amida nativas da camada ativa de poliamida da membrana (Bai *et al.*, 2018; Tang, Kwon e Leckie, 2009). Nos picos deconvoluídos para C 1s no espectro da membrana de CNC-TFC, uma maior intensidade relativa para as energias de ligação de 285,9 e 288,1 eV foi observada. Esse aumento na intensidade relativa quando comparado a membrana original de TFC é resultado da formação de ligações amida durante a reação com EDC/NHS, utilizada para ligar os CNCs à superfície da membrana. Esta observação é apoiada pela maior intensidade relativa observada para o pico na energia de ligação de 529,2 eV no espectro O 1s para a membrana de CNC-TFC, uma vez que este pico é atribuído a N-C=O.

Figura 19 - Espectros “survey” de XPS para membranas TFC e CNC-TFC (A), espectro C 1s para TFC membrana (B), espectro C 1s para membrana CNC-TFC (C), espectro O 1s para membrana TFC (D), espectro O 1s para membrana CNC-TFC (E).



Adaptado de Jackson *et al.*, 2021.

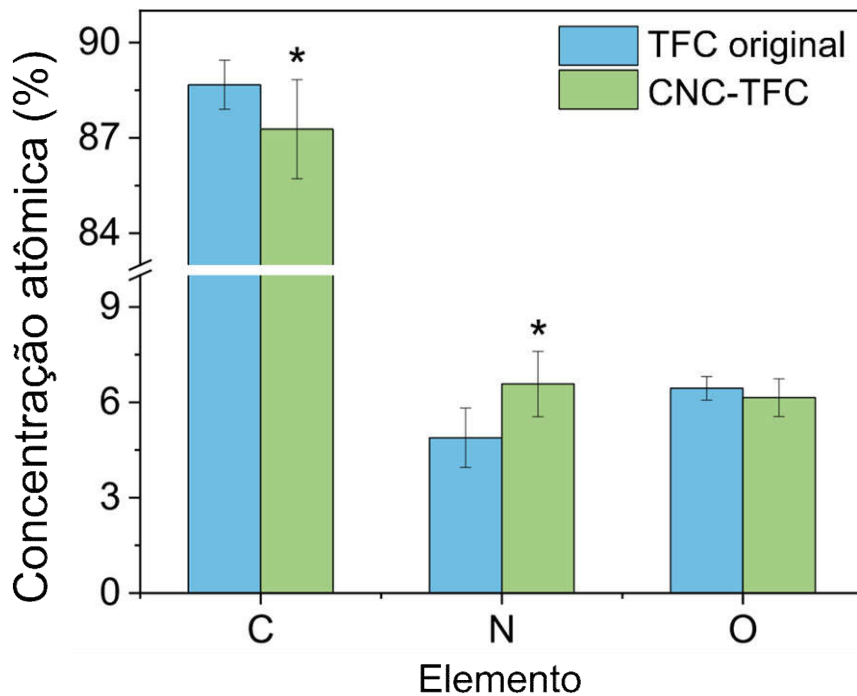
Tabela 1 - Resumo das intensidades relativas dos picos obtidos por análise de XPS das membranas de TFC e CNC-TFC.

Espectro	Energia de ligação (eV)	Ligação associada	% da área do pico (TFC)	% da área do pico (CNC-TFC)
C 1s	287,4	C-C	47,02	36,93
C 1s	285,9	N-C	47,90	56,19
C 1s	288,1	N-C=O	5,08	6,89
O 1s	529,2	N-C=O	9,28	20,41
O 1s	530,7	O-C=O	90,72	79,59

Adaptado de Jackson *et al.*, 2021.

Análises composicionais realizadas por EDS (Figura 20 e Tabela 2) mostram que a funcionalização com CNCs via *cross-linking* por amida aumentou significativamente com o conteúdo de nitrogênio e a razão N/C no TFC-CNC quando comparado com a membrana de TFC original. Por sua vez, a razão atômica O/N diminuiu de 1,4 (TFC) para 1,1 (TFC-CNC). As razões O/N por volta de 1 indicam a existência de uma rede completa de poliamida reticulada, na qual cada átomo de oxigênio está ligado via ligação amida a um átomo de nitrogênio (Shen *et al.*, 2017; Tang, Kwon e Leckie, 2009). Portanto, as razões O/N calculadas podem confirmar a imobilização de CNCs na superfície de poliamida da membrana, uma vez que baixas razões O/N são atribuídas a um alto grau de reticulação/*cross-linking* (Liu, L.-F. *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2017).

Figura 20 - Composição elementar obtida por análise de EDS das membranas TFC e CNC-TFC.



Adaptado de Jackson *et al.*, 2021.

Tabela 2 - Razões atômicas N/C, O/N e O/C obtidas por análise de EDS das membranas TFC e CNC-TFC.

Razão	TFC original	CNC-TFC
N/C	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01
O/N	1,4 ± 0,03	1,1 ± 0,1
O/C	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,01

Adaptado de Jackson *et al.*, 2021.

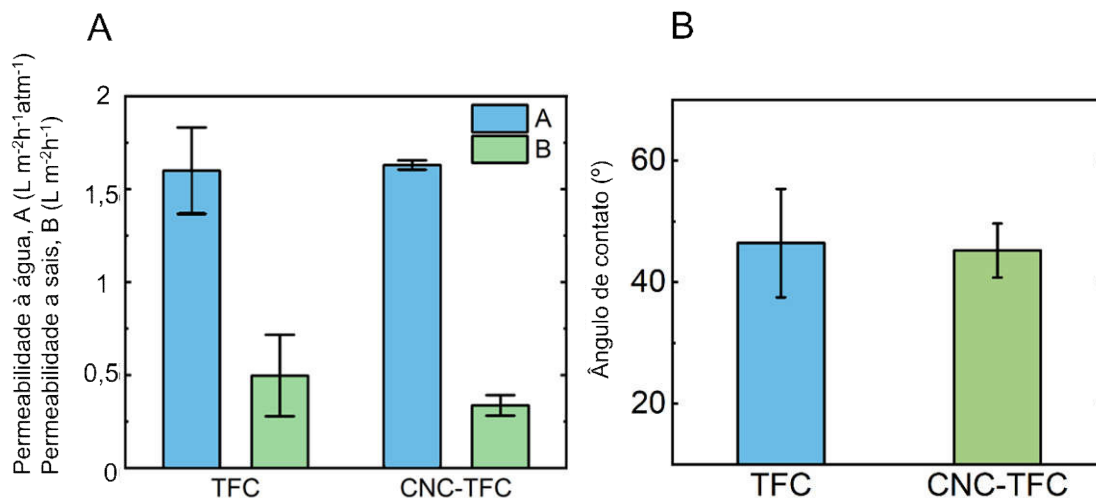
3.4.3 Avaliação das propriedades de transporte da membrana

O impacto dos CNCs na performance das membranas foi determinado através da avaliação de propriedades intrínsecas de transporte das membranas funcionalizadas (Figura 21A) em um sistema de filtração por osmose reversa de escala de bancada (Figura 22). Nem o coeficiente de permeabilidade da água, A, nem o coeficiente de permeabilidade do soluto, B, da membrana de CNC-TFC divergiram de forma estatisticamente significativa dos valores obtidos para a membrana original de TFC, a um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$). Os

valores de rejeição de NaCl foram $97,5 \pm 1,1\%$ e $98,4 \pm 0,3\%$ para as membranas de TFC originais e para as funcionalizadas com CNCs, respectivamente. Da mesma forma, a funcionalização com CNCs não resultou em qualquer diferença estatisticamente significativa no fluxo de água através da membrana, como indicado pelos valores de fluxo de água de $43,5 \pm 6,3 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ e $44,3 \pm 0,7 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ para as membranas originais de TFC e as membranas de CNC-TFC, respectivamente. Poucos estudos têm focado na aplicação de CNCs para processos de filtração por membrana e, tipicamente, aqueles que fazem uso deste nanomaterial o misturam a camada ativa da membrana com o objetivo de melhorar a seletividade da membrana e a permeabilidade à água (Asempour *et al.*, 2018; Cruz-Silva *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2019; Smith *et al.*, 2019). A imobilização química dos CNCs na superfície da membrana por EDC/NHS mediada por *cross-linking*, como descrita no presente trabalho, ainda não foi relatada na literatura. Essa estratégia de modificação de membrana tem o benefício adicional de não resultar em efeitos negativos para a excelente rejeição de sal e permeabilidade à água demonstrados pelas membranas de poliamida, como indicado pela Figura 21A.

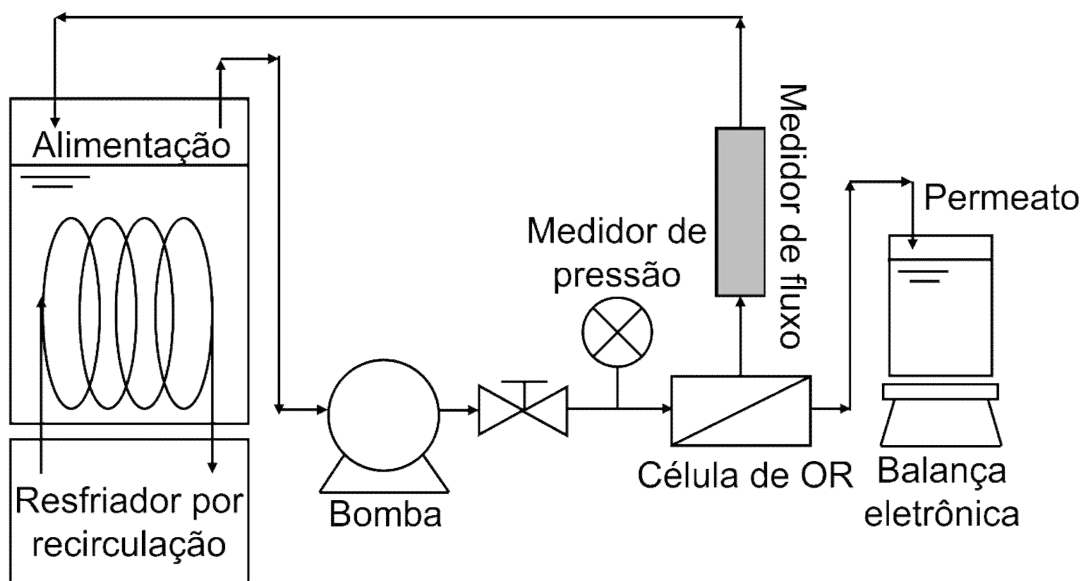
A hidrofiliabilidade da superfície da membrana de CNC-TFC foi determinada por medições de ângulo de contato através do método da gota séssil (Figura 21B). Os ângulos de contato para água obtidos para as membranas originais de TFC e CNC-TFC foram de $39 \pm 12^\circ$ e $42 \pm 5^\circ$, respectivamente. O ângulo de contato determinado para as membranas de CNC-TFC não divergiu de forma estatisticamente significativa dos valores obtidos para as membranas originais de TFC, a um nível de confiança de 95%. Estudos anteriores também relataram baixos valores de ângulo de contato para membranas comerciais de TFC (Faria *et al.*, 2017; Lü *et al.*, 2020). A relativa hidrofiliabilidade da superfície das membranas de TFC pode ser atribuído aos avanços no processo de produção das membranas comerciais. Dessa forma, a funcionalização com CNCs não foi capaz de aumentar a hidrofiliabilidade da superfície, ainda que o nanomaterial contenha muitos grupos funcionais contendo oxigênio na superfície dos nanocristais.

Figura 21 - Propriedades intrínsecas de transporte (A) e ângulos de contato para membranas originais e funcionalizadas com CNCs (B).



Adaptado de Jackson *et al.*, 2021.

Figura 22 - Representação esquemática da unidade de filtração por osmose reversa.



Adaptado de Jackson *et al.*, 2021.

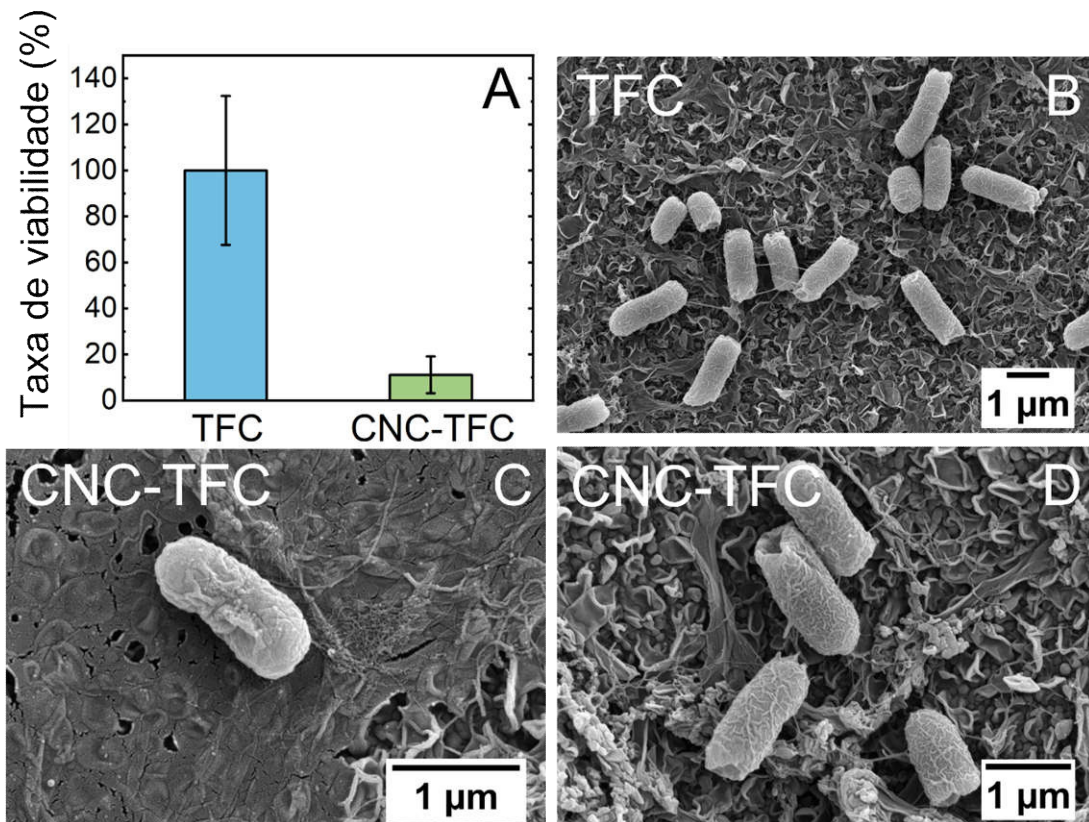
3.4.4 Determinação da atividade antimicrobiana das membranas

Para analisar as propriedades antimicrobianas das membranas modificadas, a superfície da membrana foi exposta a uma suspensão de *E. coli* por 3 h, processo seguido pelo

plaqueamento das bactérias aderidas e determinação da contagem de organismos viáveis (Figura 23A). As membranas de CNC-TFC demonstraram boa atividade antimicrobiana contra *E. coli*, indicado pela redução de organismos viáveis em $89 \pm 8\%$ em comparação ao grupo controle (membrana original de TFC). Essa atividade antibacteriana observada foi comparável ao efeito produzido por nanomateriais à base de carbono, como óxido de grafeno (Faria *et al.*, 2017; Faria, de, Perreault, Shaulsky, Arias Chavez, Laura H, *et al.*, 2015; Perreault, Tousley e Elimelech, 2014) e nanotubos de carbono de parede simples- SWCNT (Pasquini *et al.*, 2012; Tiraferri, D. Vecitis e Elimelech, 2011). A forma semelhante a um bastão e a alta razão de aspecto dos CNCs provém extremidades pontiagudas que podem promover a perfuração das bactérias conforme elas se aderem à superfície da membrana.

Análises de SEM foram utilizadas para confirmar a presença de bactérias danificadas (Figura 23) nas membranas de CNC-TFC. Células comprometidas e defeitos localizados foram observados nos microrganismos aderidos às membranas de CNC-TFC (Figura 23C e D). Um aspecto mais enrugado e contraído foi observado nas bactérias aderidas às membranas de CNC-TFC, indicando uma perda de integridade membranar, o que corrobora com o mecanismo de rompimento da membrana celular mediado por contato (Du *et al.*, 2015). Estudos focando no entendimento da toxicidade dos CNCs a bactérias são escassos; a revisão de literatura realizada para o presente estudo não localizou nenhum trabalho em que CNCs não-funcionalizados tenham sido utilizados como agente anti-incrustação biológica em membranas de osmose reversa. Além disso, os mecanismos pelos quais CNCs podem inativar bactérias ainda não apresentam um consenso. Entretanto, um estudo anterior realizado em *E. coli* sugeriu que CNCs podem inativar bactérias mediante contato através da indução de dano à membrana (Du *et al.*, 2015). Esse mecanismo foi corroborado pelos resultados apresentados no capítulo anterior deste documento. Dessa forma, as propriedades antimicrobianas de membranas podem ser melhoradas pela otimização da distribuição de CNCs em sua superfície.

Figura 23 - (A) Taxas de viabilidade para suspensões de *E. coli* incubadas por 3h com membranas TFC e CNC-TFC. Micrografias obtidas por SEM mostrando a integridade celular de bactérias na superfície de membranas de TFC (B) e CNC-TFC (C, D).



Adaptado de Jackson *et al.*, 2021.

3.5 Conclusão

A funcionalização de membranas de TFC com CNCs foi capaz de prover uma boa atividade antimicrobiana à superfície da membrana sem detrimento à sua performance de filtração. A atividade antimicrobiana observada é provavelmente decorrente da morfologia pontiaguda dos CNCs (como concluído no Capítulo I desta Tese), causando dano à membrana celular da bactéria mediante contato. Combinados com sua abundância, baixo custo de matéria prima, simplicidade da produção de CNC e sua química de superfície ajustável, estes resultados demonstram o potencial do desenvolvimento de nanomateriais à base de celulose para aplicações em engenharia ambiental.

4 CAPÍTULO III: OPTIMIZAÇÃO DE PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DE REVESTIMENTOS DE CNCs COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA

4.1 Introdução

Biofilmes são estruturas de natureza ubíqua e podem se formar em diversos ambientes de forma a proteger microrganismos que aderem a superfície. A incrustação biológica (ou *biofouling*) têm sido um tema de importante relevância, uma vez que microrganismos aderidos apresentam grande resistência à inativação e podem causar a corrosão de superfícies metálicas (Procópio, 2019), redução da performance de membranas (Bar-Zeev *et al.*, 2015; Flemming *et al.*, 1997; Jiang, Li e Ladewig, 2017), deterioração de alimentos (Hori e Matsumoto, 2010; Kumar e Anand, 1998) e danos a implantes médicos (Khatoon *et al.*, 2018; Pinto *et al.*, 2019). Prevenir que bactérias formem biofilmes sobre superfícies pode reduzir de custos econômicos provenientes da diminuição da eficiência de equipamentos ou de impactos na saúde humana.

Intervenções baseadas na utilização de recobrimentos antimicrobianos vem ganhando interesse na pesquisa de redução de impactos dos biofilmes (Garrett, Bhakoo e Zhang, 2008; Mebert *et al.*, 2016). Recobrimentos antimicrobianos comumente mitigam a bioincrustação através da inativação de microrganismos aderidos ou da prevenção da adesão superficial de modo geral. Nanomateriais a base de carbono, tais como nanotubos de carbono ou folhas de óxido de grafeno, tem sido amplamente utilizados como recobrimentos antimicrobianos que atuam na desativação dos microrganismos (Faria, de *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2019; Moraes *et al.*, 2015; Perreault *et al.*, 2015; Perreault, Fonseca de Faria e Elimelech, 2015; Rodrigues, Jaisi e Elimelech, 2013). Em contraste, escovas poliméricas, tais como as compostas por polímeros zwitteriônicos, têm sido efetivamente aplicadas na prevenção de adsorção microbiana e incrustação orgânica (Cheng *et al.*, 2007; Faria *et al.*, 2017; Liu, Lee, Ma, *et al.*, 2017). Entretanto, estes materiais apresentam a desvantagem de um processo de síntese laborioso e demorado, limitando suas aplicações.

A principal prioridade para o desenvolvimento de superfícies antimicrobianas deve ser a aplicação de materiais sustentáveis produzidos em uma escala industrial a partir de resíduos ou matérias-primas renováveis sem a utilização de compostos químicos tóxicos ou persistentes. Nanocristais de celulose (CNCs) são nanopartículas verdes produzidas por processos relativamente baratos com propriedades antimicrobianas promissoras. CNCs

demonstram uma atividade antimicrobiana comparável a outros nanomateriais à base de carbono, em virtude de sua grande área superficial específica e morfologia pontiaguda (Du *et al.*, 2015; Mahmoud *et al.*, 2010; Noronha *et al.*, 2021). Embora apresentem excelente toxicidade contra bactérias, CNCs inativam microrganismos através de mecanismos mediados por contato (Du *et al.*, 2015; Mou *et al.*, 2017; Noronha *et al.*, 2021), o que limita sua habilidade de resistir ao processo de bioincrustação, uma vez que é pouco capaz de afetar as bactérias planctônicas em suspensão.

A hibridização de CNCs com nanopartículas metálicas de prata (AgNPs) é uma estratégia vantajosa para melhoria das propriedades antimicrobianas dos CNCs e ampliação de sua habilidade em inativar bactérias em suspensão e bactérias aderidas à superfície (Liu *et al.*, 2016; Lv *et al.*, 2019). AgNPs podem ser facilmente sintetizadas, entretanto sua susceptibilidade à agregação pode ter um efeito deletério em sua propriedade antimicrobiana. Os CNCs proveem em sua superfície sítios para nucleação de prata, o que favorece a ancoragem de nanopartículas e previne o processo de aglomeração (Caschera *et al.*, 2020; He, Kunitake e Nakao, 2003). Além disso, o processo de síntese não demanda a utilização de agentes estabilizantes, que são com frequência polímeros ou compostos químicos caros ou tóxicos ao homem e ao ambiente. Agentes de recobrimento superficial também podem afetar a distribuição de tamanho e a morfologia das nanopartículas. A superfície dos CNCs contém muitos grupos funcionais hidroxila e carboxila, que funcionam como pontos de ancoragem para a deposição de AgNPs (He, Kunitake e Nakao, 2003). A associação entre AgNPs e CNCs também pode melhorar sua toxicidade, ampliando suas aplicações como agente anti-bioincrustação. Outra vantagem do composto CNC/Ag seria a toxicidade residual dos CNCs. Após a depleção de AgNPs, os CNCs remanescentes ainda poderiam conferir toxicidade a superfície.

4.2 Objetivos

- Produção de nanomaterial híbrido à base de CNCs e nanopartículas de prata e caracterização físico-química.
- Produção de revestimentos à base de nanomaterial híbrido CNC/Ag e análise de propriedades anti-incrustação biológica.
- Avaliação de toxicidade dos nanomateriais a células planctônicas de bactérias modelo

(*Escherichia coli*, Gram-negativa e *Bacillus subtilis*, Gram-positiva).

- Avaliação de mecanismos de toxicidade através da interação com vesículas lipídicas, testes de quantificação de estresse oxidativos e cinética de interação com bactérias.

4.3 Materiais e métodos

4.3.1 Preparação e caracterização de nanomateriais híbridos CNCs-Prata (CNC/Ag)

CNCs em dispersão aquosa foram obtidos a partir de folhas de capim-elefante utilizando um protocolo baseado em oxidação mediada por TEMPO e subsequente sonicação das fibras ricas em celulose, conforme descrito previamente (Camargos e Rezende, 2021). Em seguida, CNC/Ag foi produzido utilizando metodologia adaptada de estudos anteriores (Liu, H. *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2013): 20 mL de uma suspensão de CNC a 1000 µg/mL foi preparada pela ressuspensão de uma alíquota da suspensão estoque em água destilada através de sonicação. Em sequência, foram adicionados 2 mL de uma solução aquosa de AgNO₃ a 10 mM na dispersão de CNC. Após 1 h de agitação, 2 mL de uma solução aquosa de NaBH₄ 10 mM foi adicionada a dispersão, que se manteve sob agitação por mais 1 h. A dispersão de CNC/Ag foi transferida para um saco de diálise (membrana Spectra/por com corte de peso molecular de 3,5 kDa, Spectrum Laboratories, EUA) e dialisada em água deionizada por 2 h. Depois da diálise, a dispersão CNC/Ag resultante foi armazenada e utilizada em ensaios posteriores. Com base na quantidade inicial de precursores utilizados, as concentrações de CNC e Ag foram estimadas em 833 µg/mL e 0,833 mM, respectivamente. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi utilizada para investigar a morfologia do CNC/Ag. Um volume de 10 µL da suspensão de CNC/Ag (~ 10 µg/mL) foi depositado em uma grade de níquel de 400-mesh recoberta com Formvar e carbono (TedPella, Redding, CA, EUA). A grade contendo CNC/Ag foi então recoberta com 10 µL de uma solução de acetato de uranila 0,5% e seca em ar por 30 s. As análises foram realizadas em um microscópio de transmissão eletrônica FEI Tecnai G2 Spirit Twin (FEI Corp., Hillsboro - OR, EUA) equipado com uma câmera UltraScan e o software Digital Micrograph (Gatan Inc., Pleasanton - CA, EUA). O diâmetro médio das AgNPs foi medido considerando 134 partículas analisadas através do software Image J.

As características químicas dos CNCs e do nanomaterial híbrido CNC/Ag foram analisadas através de espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS), conforme descrito

anteriormente (Jackson *et al.*, 2021). Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier modo de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) foi utilizada para obtenção dos espectros das amostras de CNC e CNC/Ag liofilizadas. A análise foi realizada em um espectrômetro Cary 630 FTIR (Agilent Technologies, Santa Clara - CA, EUA) com uma resolução de 4 cm^{-1} e 128 leituras.

O montante de íons Ag^+ liberados pelo CNC/Ag foi mensurado através de um protocolo adaptado de um estudo previamente publicado (Xu *et al.*, 2020). Primeiramente, 15 mL de uma dispersão aquosa de CNC/Ag $1500\text{ }\mu\text{g/mL}$ (em triplicata) foram dialisados em água deionizada por 24 horas. Um volume de 100 mL da solução contendo Ag^+ foi coletado imediatamente no início do processo de diálise e a cada 1 h por 6 h, após 12 horas e após 24 horas. Após cada coleta, a solução de diálise foi trocada por água deionizada. As soluções coletadas foram acidificadas com HNO_3 0,2% (m/m) e a concentração de Ag liberado foi medida utilizando espectrometria de absorção atômica em um atomizador AA600 com forno de grafite (GFAAS, PerkinElmer, Waltham - MA, EUA).

4.3.2 Difração de raios X (XRD)

Análises de XRD foram realizadas em um difratômetro XRD-6000 (Shimadzu, Quioto, Japão), operando a 40 kV e 30 mA. As medidas foram realizadas utilizando uma variação angular de 2Θ entre 5° e 70° a uma velocidade de varredura de $2^\circ/\text{min}$ sob temperatura ambiente (Alharthi *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2010).

4.3.3 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica foi realizada em um analisador termogravimétrico TGA 2950 (TA instruments, New Castle - Delaware, EUA), usando uma variação de temperatura de 21 a $800\text{ }^\circ\text{C}$, a uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ sob fluxo de ar. 4 mg da amostra liofilizada (CNC e CNC/Ag) foram utilizados nesta análise (Errokh *et al.*, 2019; Liu, J. *et al.*, 2018).

4.3.4 Medições de potencial zeta

O potencial zeta de CNC e CNC/Ag foi avaliado através de medidas de espalhamento de luz eletroforético em um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, Reino Unido).

Dispersões de 1000 µg/mL e CNC/Ag 833 µg/mL (pH 5) foram submetidas à sonicação em banho por 15 min antes da realização da análise. As medições foram realizadas em triplicata.

4.3.5 *Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS)*

A cinética de aglomeração de CNC/Ag em água deionizada e em caldo LB foi monitorada por 6 h através de medições de DLS. Para isto, uma solução estoque de CNC/Ag foi sonicada em banho por 15 min e diluída em cada solvente para atingir uma concentração de 300 µg/mL. O diâmetro hidrodinâmico foi então monitorado em um Zetasizer Nano ZS (Malvern, Reino Unido), utilizando um tempo de acumulação de auto-correlação de 100 s, com um intervalo de 200 s entre cada medida.

4.3.6 *Análise de estabilidade com espectroscopia UV-Vis*

A estabilidade de dispersões de CNC/Ag no meio de cultura utilizado para os testes de viabilidade bacterianos foi avaliada através de espectroscopia UV/Vis. CNC/Ag foi misturado a 1,5 mL de caldo LB para obtenção de uma dispersão com uma concentração de 100 µg/mL de CNC/Ag (triplicata). As dispersões foram então incubadas a temperatura ambiente e ausência de agitação para análise em UV-Vis. A análise foi realizada em um espectrofotômetro Specord 250 (Analytik Jena, Alemanha) a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 h de incubação. A aquisição dos espectros foi realizada em modo de varredura de 350 a 700 nm com um delta lambda de 1 nm e uma velocidade de aquisição de 10 nm/s. A cubeta de referência para análise foi preenchida com caldo LB diluído (2x) em água deionizada.

4.3.7 *Atividade anti-bioincrustação das superfícies recobertas com CNC e CNC/Ag*

Dispersões aquosas contendo 500 µg/mL de CNC e CNC/Ag em água deionizada foram preparadas e filtradas através de filtros de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (tamanho de poro de 0,22 µm), resultando em filtros recobertos com CNC e CNC/Ag. Filtros originais de PVDF sem qualquer nanomaterial depositado foram utilizados como amostras controle. *E. coli* (American Type Culture Collection ATCC 8739) e *B. subtilis* (ATCC 6633) foram cultivados em caldo LB a 37 e 30 °C, respectivamente, em uma incubadora. Após crescimento de um dia para o outro, 1 mL de cada suspensão bacteriana foi misturado com 24 mL de caldo

LB (1:25) e mantido sob agitação até que a suspensão pudesse atingir uma densidade óptica (600 nm) próxima a 1, indicando crescimento exponencial (~2 h). A suspensão resultante foi então centrifugada e as células bacterianas recuperadas foram lavadas por centrifugação 3 vezes com NaCl 0,9% estéril. A suspensão bacteriana foi diluída por 10 vezes em solução salina estéril para obtenção de uma suspensão bacteriana a 10^8 UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mL). Um volume de 3 mL de suspensão bacteriana foi colocado sob cada filtro e então as amostras foram incubadas por 3 h. Após esse período, a suspensão bacteriana foi gentilmente removida e a superfície dos filtros foi lavada com solução salina estéril para remoção de bactérias não-aderidas. Os filtros foram então transferidos para um tubo de centrífuga de 50 mL preenchido com 10 mL de solução salina e submetidos a sonicação em banho por 15 min, para promover o desligamento das células aderidas aos filtros. A concentração de células em cada suspensão foi quantificada através de contagem em placa. Todos os testes de atividade antimicrobiana foram realizados em triplicata.

4.3.8 Caracterização morfológica das bactérias aderidas

Procedimento realizado conforme descrito no capítulo I, seção 2.3.7.

4.3.9 Propriedades antibacterianas de CNC e CNC/Ag em células bacterianas planctônicas

A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos nanomateriais foi determinada através do método de microdiluição, usando um protocolo baseado nas diretrizes do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Balouiri, Sadiki e Ibsouda, 2016; Moraes *et al.*, 2015). Brevemente, colônias de *E. coli* ou *B. subtilis* cultivados em placas com meio ágar LB foram transferidos para um tubo contendo 10 mL de caldo LB e incubados de um dia para o outro na temperatura ótima de crescimento para cada bactéria (37 °C para *E. coli* e 30 °C for *B. subtilis*). Depois do crescimento, uma alíquota de cada suspensão foi ressuspensa em solução salina (NaCl 0,9%) até que a densidade óptica a 600 nm (OD_{600}) ficasse entre 0,08 e 0,12. Depois disso, 200 μ L de cada suspensão bacteriana foi individualmente transferida para 30 mL de caldo LB, resultando em uma concentração bacteriana estimada de 10^6 UFC/mL. Um volume de 1 mL de cada suspensão

bacteriana foi misturado com 1 mL de cada dispersão de nanomaterial (CNC ou CNC/Ag) em frascos de vidro, atingindo concentrações finais de 0, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 e 300 µg/mL. Os frascos contendo as bactérias e os nanomateriais foram vortexados e 200 µL de cada amostra foi pipetada em seis poços em uma microplaca. As placas foram incubadas por 18-24 h à temperatura ótima para cada bactéria. Após esse período de incubação, a densidade óptica a 600 nm de cada poço foi quantificada em um leitor de microplacas (SpectraMax M5 Multi-Mode, Molecular Devices, Sunnyvale—CA, USA). A densidade óptica dos poços no tempo inicial foi utilizado como controle. Os valores de absorbância foram expressos subtraindo as leituras iniciais das leituras ao final do período de incubação. A CIM é a concentração mais baixa de nanomaterial que é capaz de inibir o crescimento bacteriano após o período de incubação. Uma vez que a densidade óptica está diretamente relacionada com o crescimento bacteriano, valores de absorbância inalterados indicam a ausência de crescimento bacteriano detectável.

Para determinação da CBM, 20 µL da amostra controle (sem nanomateriais) foi adicionada a 20 mL de solução salina. A suspensão foi homogeneizada, 100 µL da suspensão resultante foi cultivada em placas de ágar LB em triplicata. Aliquotas de 20 µL foram retirados dos poços contendo CNC/Ag na concentração inibitória mínima e das duas concentrações maiores seguintes e, em sequência, espalhados em placas de ágar LB para determinação do número de UFC/mL. O valor da CBM é a concentração capaz de reduzir pelo menos 99,9% do número de colônias viáveis em comparação ao inóculo inicial. A razão CBM/CIM pode ser utilizada para categorizar a atividade antibacteriana, com um valor entre 1 e 2 correspondendo a atividade bactericida e um valor maior que 2 correspondendo a um efeito bacteriostático (Moraes *et al.*, 2015).

4.3.10 Avaliação de cinética de toxicidade de bactérias planctônicas expostas a CNCs e CNC/Ag

Para analisar a atividade antibacteriana dos nanomateriais ao longo do tempo, experimentos baseados em protocolos do CLSI foram empregados (Balouiri, Sadiki e Ibsouda, 2016; Konaté *et al.*, 2012; Moraes *et al.*, 2015). CNC/Ag foi utilizado em sua CIM para cada bactéria (25 µg/mL for *B. subtilis* e 100 µg/mL for *E. coli*). Dispersões de CNCs com as mesmas concentrações das dispersões de CNC/Ag foram utilizadas como controles comparativos. Uma alíquota (variando de 200 a 1000 µL) de cada suspensão bacteriana

cultivada de um dia para o outro em caldo LB foi transferida para um frasco de vidro contendo 5 mL de solução salina para obtenção de um valor de OD₆₀₀ entre 0,08 e 0,12. Uma alíquota de 200 µL de cada uma dessas suspensões foi adicionada a 30 mL de caldo LB, resultando em uma concentração aproximada de 10⁶ UFC/mL. O ensaio foi então realizado misturando-se 1 mL da suspensão bacteriana com 1 mL da dispersão de cada nanomaterial para uma concentração final de 25 µg/mL (CNC e CNC/Ag × *B. subtilis*) ou 100 µg/mL (CNC e CNC/Ag × *E. coli*). Água deionizada (1 mL) foi misturada a suspensão bacteriana para utilização como amostra controle. Os frascos foram incubados a temperatura ambiente e agitação de 60 rpm. Uma alíquota de 100 µL de cada frasco foi retirada em diferentes tempos de incubação (0, 1, 2, 3, 4,5, e 6 h) e diluída serialmente (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) em solução salina. Cinco gotas de 20 µL de cada diluição foram plaqueada em ágar LB e incubadas de um dia para o outro à temperatura ótima de crescimento para cada bactéria. A concentração bacteriana foi calculada através da contagem de colônias. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.3.11 Oxidação *in vitro* de GSH após exposição a CNC e CNC/Ag

O ensaio de oxidação de GSH têm sido consistentemente utilizado na literatura para determinar a habilidade do nanomaterial em induzir estresse oxidativo (Hellack *et al.*, 2017). GSH é um antioxidante natural que protege as células contra estresse oxidativo (Fahey *et al.*, 1978; Kurutas, 2015). Sob a presença de espécies oxidativas, GSH é oxidada para sua forma dissulfeto. O montante de GSH está diretamente relacionado ao potencial oxidativo de nanomaterial (Hellack *et al.*, 2017). O GSH não-oxidado reage com o reagente de Ellman, produzindo um composto de amarelado (3-tio-6-nitrobenzoato, TNB), cuja absorvância óptica foi quantificada em um espectrofotômetro (Hitachi U-2900, Japão). Detalhes deste protocolo podem ser encontrados no capítulo anterior (Noronha *et al.*, 2021). O montante de TNB presente está diretamente relacionado ao GSH oxidado e pode ser calculado utilizando um coeficiente de extinção de 14150 M⁻¹ cm⁻¹ e um caminho óptico de 1 cm. Uma solução sem nanomaterial foi utilizada como controle negativo e uma solução de H₂O₂ (10 mM) foi utilizada como controle positivo. A quantidade residual de GSH em cada amostra foi obtida e os resultados foram expressos como perda percentual de GSH comparada a amostra controle (sem nanomaterial).

4.3.12 Quantificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares provenientes da exposição a CNC/Ag

A presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) dentro das células bacterianas provenientes da exposição a CNC/Ag foi avaliada através da utilização de H₂DCFDA, conforme descrito no capítulo 1 (Barrios *et al.*, 2019; Noronha *et al.*, 2021). Primeiramente, 1,9 mL de uma suspensão de *E. coli* (10⁸ UFC/mL) em água peptonada (0,1%) foi misturado com uma suspensão de CNC/Ag a 100 µg/mL. Os frascos foram incubados por 3 h a 60 rpm em temperatura ambiente. Um volume de 40 µL de H₂DCFDA (10 mM, dissolvido em etanol) foi adicionado a 2 mL de uma suspensão contendo bactérias e CNC/Ag, para uma concentração final de H₂DCFDA de 0,2 mM. Os frascos foram recobertos com papel alumínio e mantidos afastados da luz por 15 min. Alíquotas de 200 µL dessa suspensão foram então transferidas para uma placa de 96 poços para quantificação de fluorescência. Esterases intracelulares hidrolisam o H₂DCFDA a H₂DCF (2',7'-diclorodihidrofluoresceína), um composto não fluorescente que permanece dentro das células. Sob a presença de EROs e peroxidases intracelulares, H₂DCF é transformado em um composto altamente fluorescente denominado DCF (2',7'-diclorofluoresceína). O sinal fluorescente se correlaciona com a presença de EROs nas células bacterianas. A quantificação de fluorescência foi realizada em um leitor de microplacas Cytation 5 (Biotek Instruments, Vermont, EUA), utilizando 493 nm e 520 nm como comprimentos de onda de emissão e excitação, respectivamente. Menadiona (100 µM), um agente oxidante conhecido por induzir a geração de EROs, foi utilizado como controle positivo (Criddle *et al.*, 2006). Os valores de intensidade de fluorescência foram normalizados com relação às amostras controles sem nanomaterial.

4.3.13 Preparação de vesículas lipídicas contendo corante e ensaio de extravasamento de corante

Vesículas lipídicas contendo corantes foram utilizadas para analisar a habilidade do CNC e CNC/Ag em romper bicamadas lipídicas, como realizado em estudos anteriores (Zucker *et al.*, 2017, 2019). Detalhes do protocolo de preparação destas vesículas estão descritos no capítulo I, seção 2.3.10.

Para realização do ensaio de extravasamento de corante, 822 µL da suspensão de vesículas preparada foi misturado com cada nanomaterial, resultando em uma concentração

de CNC e CNC/Ag de 200 µg/mL em um volume final de 1,5 mL. As misturas foram mantidas sob agitação em gangorra por 3 h a temperatura ambiente. Após isso, as suspensões foram agitadas em vórtex por 10 seg e as misturas resultantes foram centrifugadas a 15.000 rcf por 15 min. A absorvância do sobrenadante a 500 nm foi medida em um espectrofotômetro Genesys 30 (ThermoFisher Scientific, Waltham - MA, EUA). Como controle negativo, água deionizada foi utilizada no lugar da suspensão de nanomaterial. Cada tratamento foi preparado e analisado em triplicata. Para determinar a intensidade máxima de absorvância (Abs_{max}), a suspensão de vesículas foi misturada com 0,1 g/mL de laurel sulfato de sódio (SLS), o que promove a liberação de laranja de acridina na solução. A intensidade média de absorvância em cada tratamento foi dividida pela média da absorvância máxima obtida da solução tratada com SLS, os resultados, então, são apresentados como valores normalizados (Lu *et al.*, 2017).

4.3.14 Caracterização de biofilme através de microscopia confocal

O crescimento de biofilme sob as superfícies dos filtros foi avaliado de acordo com uma metodologia adaptada de um trabalho previamente publicado (Liu *et al.*, 2021). *E. coli* (American Type Culture Collection ATCC 8739) e *B. subtilis* (ATCC 6633) foram cultivados em caldo LB a 37 °C e 30 °C, respectivamente, em uma incubadora. Após crescimento de um dia para outro, as suspensões bacterianas foram diluídas em caldo LB (1:25) e cultivadas sob agitação moderada até que a densidade óptica a 600 nm atingisse valores próximos a 1, correspondendo a fase log de crescimento. As bactérias foram recuperadas por centrifugação e lavadas por 2 vezes com solução salina estéril para remoção do excesso de constituintes do meio de cultura. A suspensão de bactérias obtida foi então diluída (1:10) em solução salina estéril para obtenção de uma concentração próxima a 10^8 UFC/mL. Os filtros foram dispostos em placas de 6 poços e incubados com 3 mL da suspensão bacteriana obtida ($\sim 10^8$ UFC/mL). As placas foram incubadas a temperatura ótima para cada bactéria durante 3 h. Após isso, o conteúdo dos poços foi descartado e os filtros foram cuidadosamente lavados com 3 mL de solução salina por duas vezes. 3 mL de caldo LB foram adicionados sob os filtros em cada poço e as amostras foram incubadas de um dia para o outro (~ 18 h) a temperatura ótima para cada bactéria. Um volume de 1 mL da solução de coloração LIVE/DEAD® BacLight (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EUA) foi adicionado sobre a superfície de cada filtro e as amostras foram incubadas protegidas da luz por 20 min. SYTO9 e iodeto de

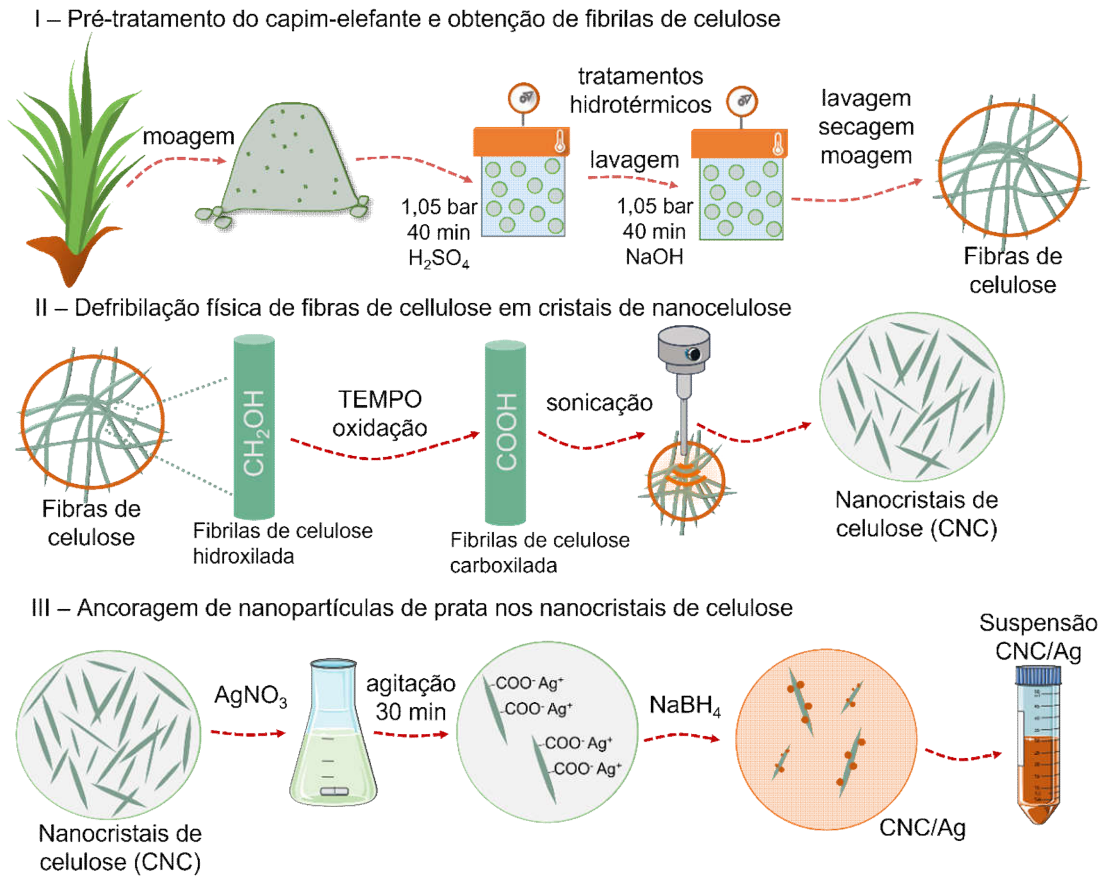
propídio (PI) presentes não solução marcam células vivas e mortas, respectivamente. Por fim, os filtros foram cuidadosamente lavados com 3 mL de salina por duas vezes anteriormente a análise em microscópio confocal. Imagens 3D com mapeamento no eixo Z dos biofilmes formados foram obtidas em um microscópio confocal Zeiss LSM 710 através de uma lente objetiva plana-apocromática com um aumento de 20x. Um laser de argônio com comprimento de onda de 488 nm e um laser de hélio-neônio com comprimento de onda de 543 nm foram utilizados como fontes de excitação para o SYTO9 e o PI, respectivamente.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Caracterização do CNC/Ag

CNCs oxidadas por TEMPO foram utilizadas como plataformas para a ancoragem de AgNPs. A existência de carboxilato de sódio e grupos funcionais hidroxila na superfície do CNC favorecem a troca de íons Na^+ por Ag^+ , em virtude da adição de AgNO_3 (Hoeng *et al.*, 2015; Ifuku *et al.*, 2009). Os íons Ag^+ aderidos são reduzidos *in situ* pelo NaBH_4 para formação de AgNPs imobilizadas na superfície do CNC (Ifuku *et al.*, 2009; Liu, H. *et al.*, 2011). O processo completo de síntese é representado na Figura 24.

Figura 24 - Ilustração do processo completo de síntese CNC/Ag.

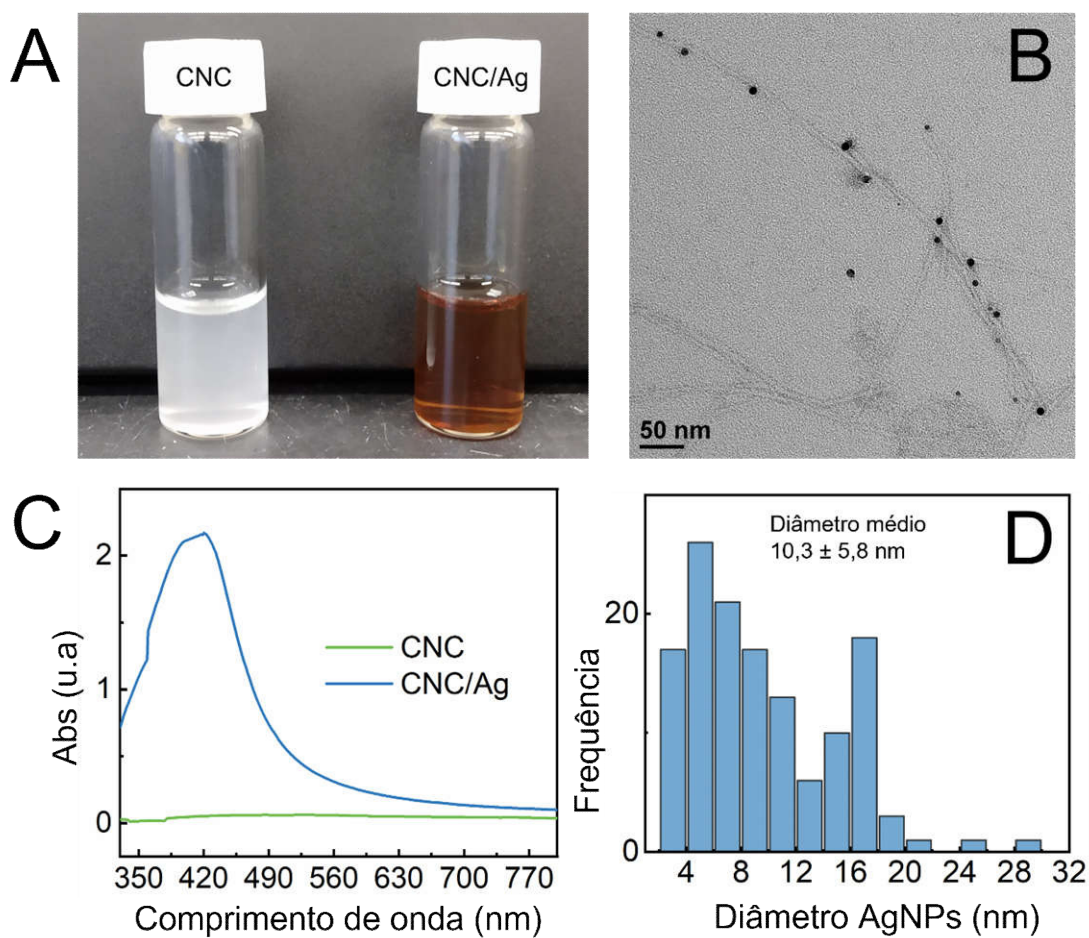


Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

A Figura 25A mostra fotografias das dispersões de CNCs e CNC/Ag. A dispersão original de CNCs apresenta uma coloração esbranquiçada, enquanto a dispersão de CNC/Ag tem coloração castanha, característica que indica a presença de AgNPs no sistema. A banda de absorção no espectro UV-Vis próxima a 420 nm da amostra de CNC/Ag corresponde ao efeito de ressonância plasmônica de superfície promovido pelas AgNPs (Smitha *et al.*, 2008). Sua aparência sugere a ancoragem das AgNPs na superfície do CNC (Figura 25B). Perfis de difração de raios X (XRD) de CNCs e CNC/Ag mostram os típicos picos de difração da celulose I próximos a 15,6, 22,6, e 34,4° (2θ), correspondendo aos planos 101, 002 e 040 da celulose, respectivamente (Park *et al.*, 2010). Por outro lado, o pico a 38,7° (2θ) no padrão de XRD do CNC/Ag corresponde ao plano 111 das AgNPs (Figura 26) (Alharthi *et al.*, 2020). Análises de termogravimetria (TGA) foram conduzidas para estimar a quantidade relativa de prata no nanomaterial CNC/Ag (Figura 27). Após a decomposição térmica, a massa remanescente na amostra de CNC foi de 1,18%, enquanto o conteúdo de cinzas da amostra de

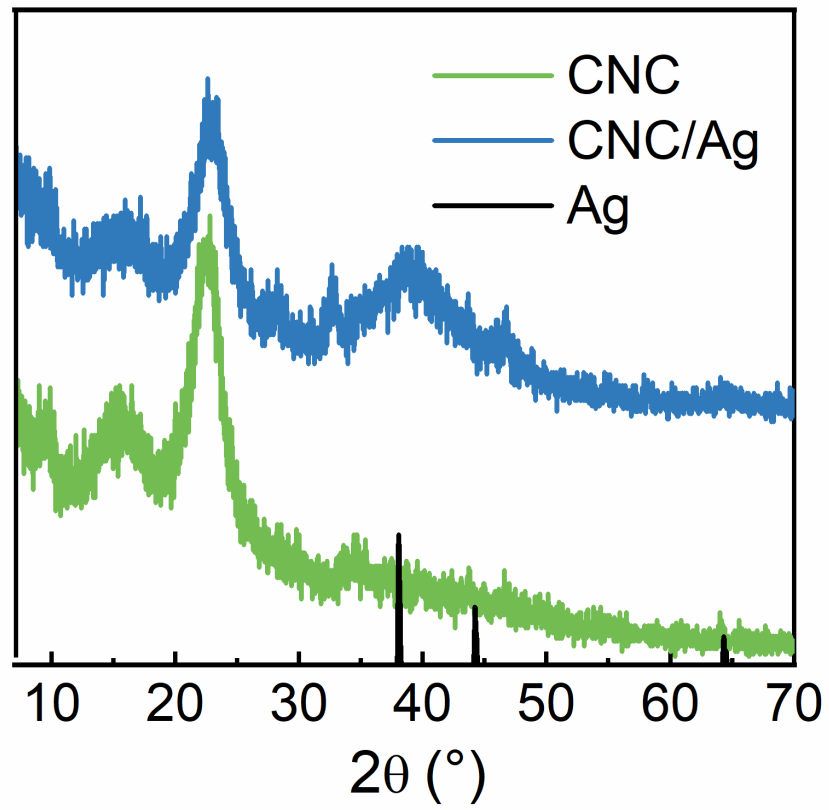
CNC/Ag foi de 12,54% da sua massa inicial. Estes resultados indicam que o montante de Ag ancorado nos CNCs foi cerca de 11% de sua massa total, valor congruente com trabalhos anteriores (Errokh *et al.*, 2019; Liu, J. *et al.*, 2018).

Figura 25 - (A) Fotos de dispersões CNC e CNC/Ag, (B) Micrografia obtida por TEM de partículas CNC/Ag, (C) espectros de absorção UV-vis de dispersões de CNC e CNC/Ag, e (D) histograma com distribuição de tamanho de AgNPs ancoradas nos CNCs.



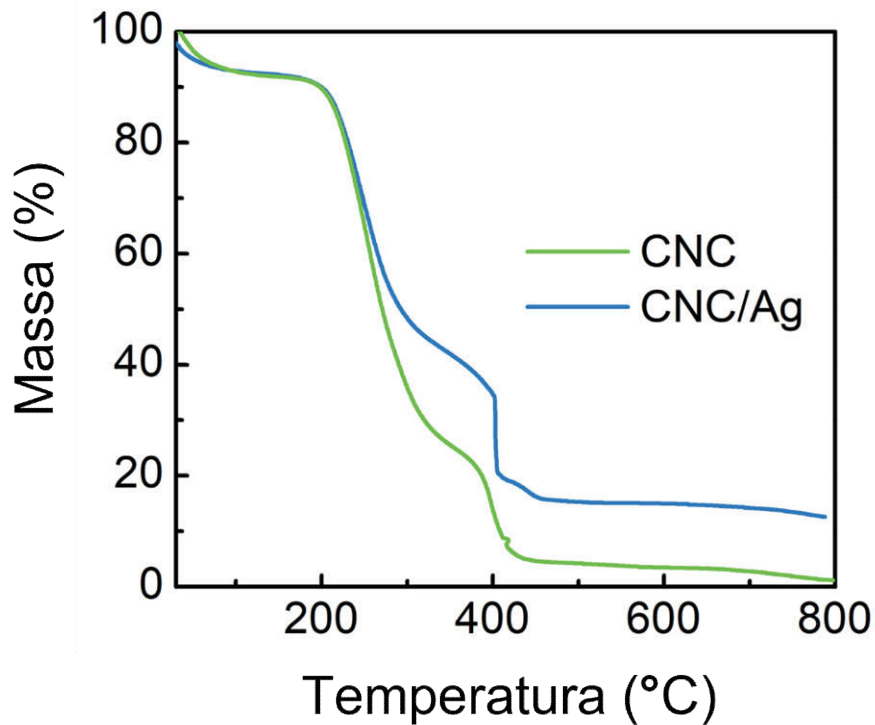
Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

Figura 26 - Perfis de difração de raios X de CNC, CNC/Ag e prata em pó (Ag).



Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

Figura 27 - Análise termogravimétrica de CNC e CNC/Ag.

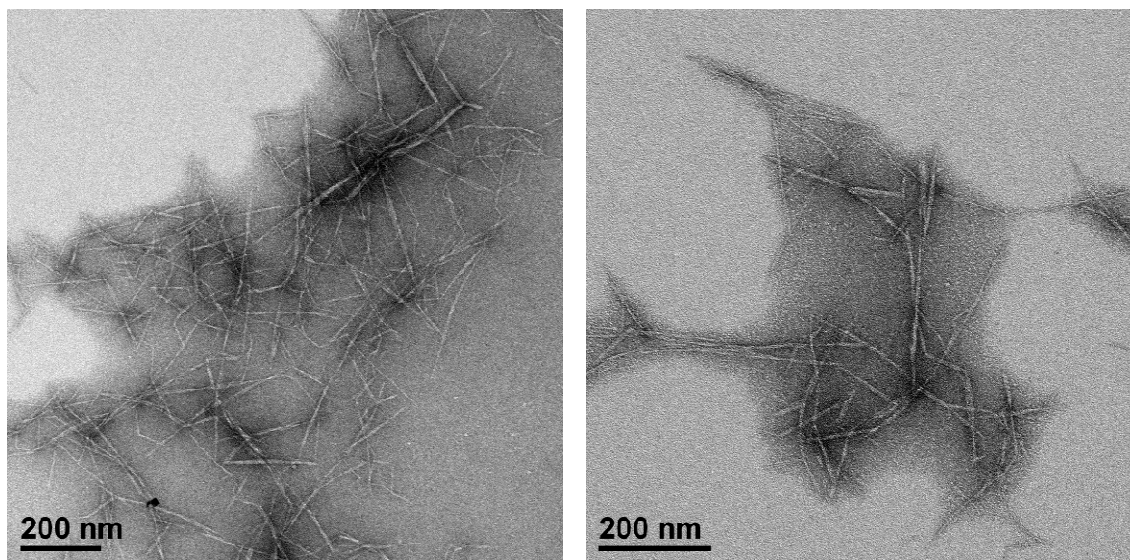


Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

As propriedades morfológicas dos CNCs e a nucleação de AgNPs no CNC/Ag foi confirmado através de TEM (Figura 28 e Figura 25B). As imagens de TEM mostram partículas esféricas distribuídas na superfície dos CNCs (Figura 25B). As interações eletrostáticas entre os cátions Ag^+ e os grupos funcionais aniônicos contendo oxigênio nos CNCs contribuem para que as AgNPs se distribuam de forma homogênea e permaneçam fortemente ancoradas nos nanocristais (He, Kunitake e Nakao, 2003; Ifuku *et al.*, 2009; Liu, H. *et al.*, 2011). Como previamente discutido na literatura (He, Kunitake e Nakao, 2003), as interações fortes entre ambos os constituintes facilitam a nucleação da prata, prevenindo o crescimento de AgNPs ou polidispersividade. As AgNPs que decoram a superfície dos CNCs mostraram uma estreita distribuição de diâmetro: $10,3 \pm 5,8$ nm (Figura 25D). AgNPs imobilizadas em nanofibras de celulose bacteriana oxidadas por TEMPO demonstraram um diâmetro médio de 10 a 20 nm (Ifuku *et al.*, 2009), enquanto AgNPs imobilizadas em fibras porosas de celulose mostraram um tamanho de aproximadamente $7,9 \pm 2,4$ nm (He, Kunitake e Nakao, 2003). Além disso, AgNPs ancoradas na superfície de CNCs obtidos por hidrólise ácida ou oxidação por TEMPO mostraram um tamanho médio variando de 25 nm (Fan *et al.*,

2019) a $9,7 \pm 3,6$ nm (Liu, H. *et al.*, 2011), respectivamente, o que corrobora com o tamanho de partícula obtido neste trabalho.

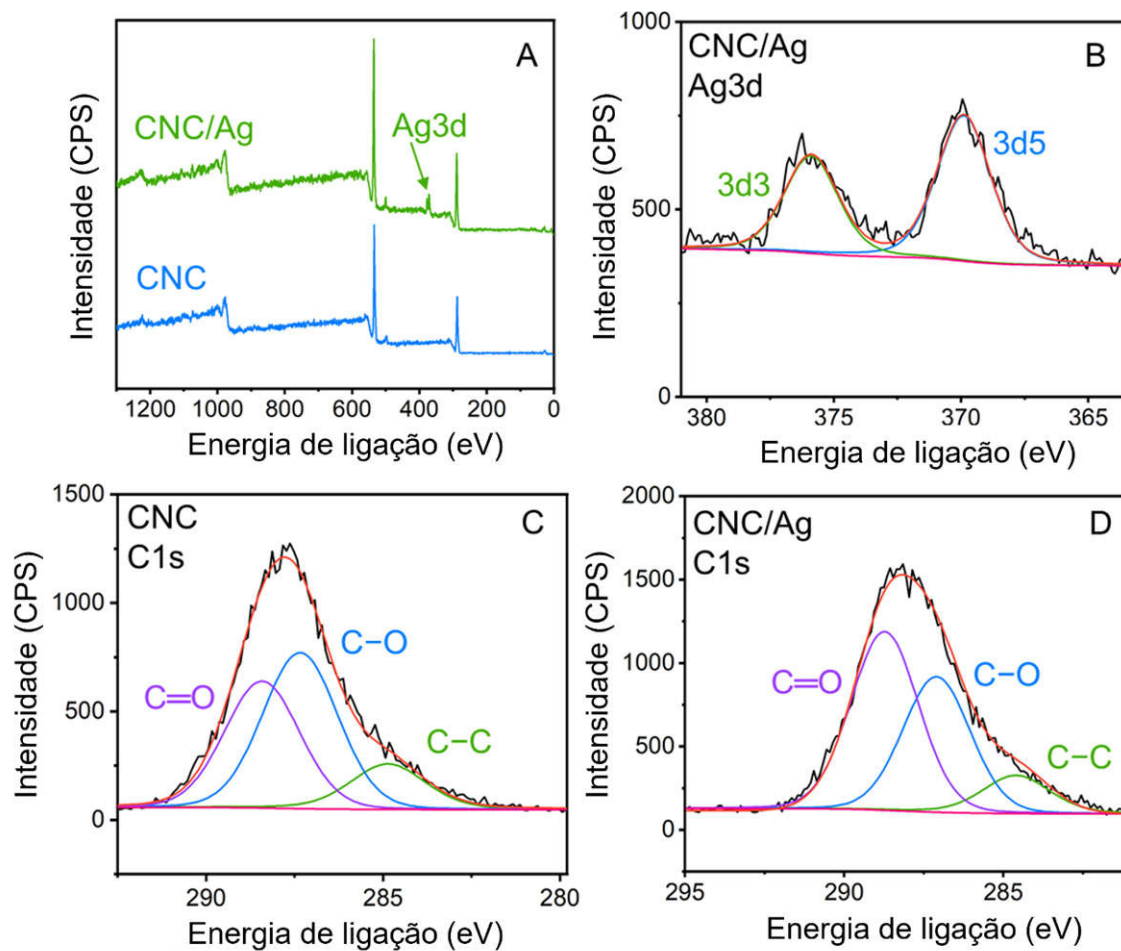
Figura 28 - Micrografias obtidas por TEM dos nanocristais de celulose.



Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

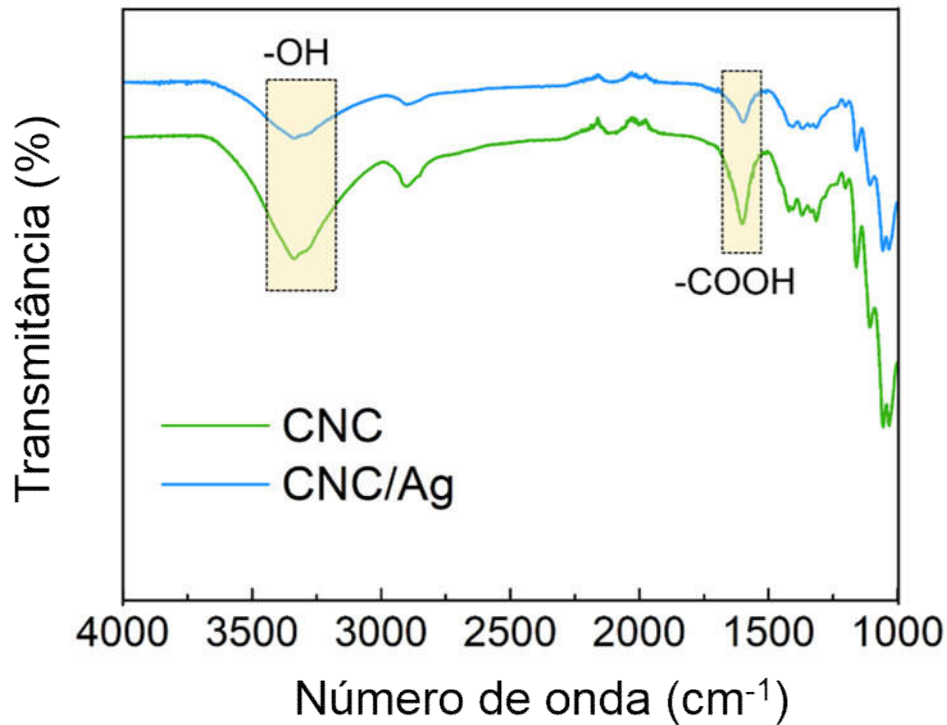
Como mostrado pelos dados de XPS, o pico dubleto de Ag 3d próximo a 370 eV confirma a presença de AgNPs no nanomaterial CNC/Ag (Figura 29). O espectro de maior resolução na Figura 29D mostra que o dubleto Ag 3d consiste de dois picos conjugados localizados a 369,9 eV, atribuído a Ag 3d_{5/2} e 375,9 eV, atribuído a Ag 3d_{3/2}. A energia de 6 eV que separa estes picos conjugados é atribuída a presença de prata zero-valente (Ma *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021), indicando a existência de AgNPs metálicas no nanomaterial híbrido CNC/Ag. Análises de ATR-FTIR confirmam que a estrutura química da celulose ainda está presente no nanomaterial híbrido (Figura 30).

Figura 29 - Espectros “survey” de XPS para CNC e material híbrido CNC/Ag (A), picos Ag 3d para CNC/Ag (B), espectro C 1s para CNC e CNC/Ag, respectivamente (C e D).



Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

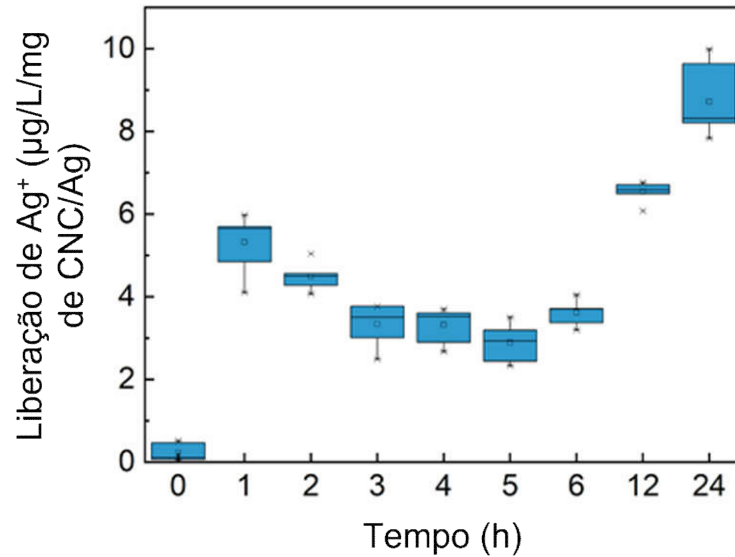
Figura 30 - Espectros ATR-FTIR de CNC e CNC/Ag.



Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

A liberação de íons Ag^+ do CNC/Ag em água foi avaliada através de espectrometria de absorção atômica. Como mostrado na Figura 31, na primeira hora do processo de lixiviação, a concentração de íons Ag^+ aumentou de 0,1 a 5,3 $\mu\text{g/L}$ por mg de CNC/Ag. Após uma liberação estável de cerca de 4 $\mu\text{g/L}$ dentre as primeiras 5 horas, a concentração de íons Ag^+ aumentou para 8,7 $\mu\text{g/L/mg}$ de CNC/Ag após as primeiras 24 h. O montante absoluto de Ag^+ liberado para 1000 μg de CNC/Ag depois de 24 h foi aproximadamente 0,9 μg , resultando assim em uma performance antibacteriana prolongada do nanomaterial híbrido (Xu *et al.*, 2020). Íons Ag^+ a uma concentração mínima de 0,1 $\mu\text{g/L}$ apresentam alta eficácia antimicrobiana, uma vez que estes cátions são capazes de interagir fortemente com grupos doadores de elétrons (grupos S, O e N) em moléculas biológicas (Kumar e Münstedt, 2005).

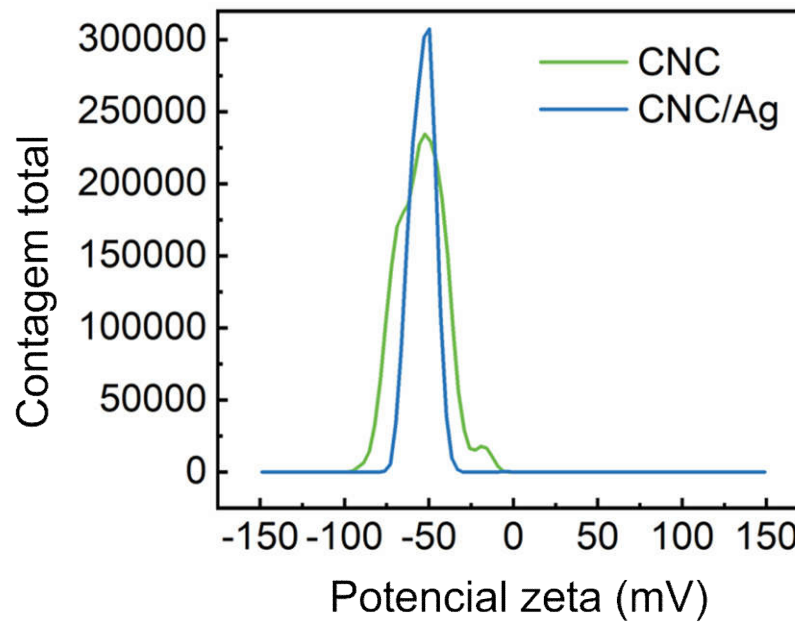
Figura 31 - Perfil de liberação de Ag^+ do CNC/Ag em água em função do tempo. A concentração equivalente de íons prata liberados por 1 mg de CNC/Ag foi calculada a partir de valores de ppb obtidos diretamente por GFAAS.



Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

Para avaliar o efeito da decoração com prata na estabilidade coloidal do CNC/Ag, medições de potencial zeta das dispersões de CNCs e CNC/Ag em água foram realizadas. Como indicado pelos dados da Figura 32, a presença de AgNPs não afetou o potencial zeta do nanomaterial. O potencial zeta dos nanomateriais foi similar, passando de $-54,6 \pm 13,9$ mV para $-54,0 \pm 6,81$ mV após a funcionalização com AgNPs. Uma vez que os potenciais zeta apresentam valores semelhantes, seria esperado que os nanomateriais apresentem estabilidades coloidais similares sob as condições empregadas neste trabalho.

Figura 32 - Distribuição de potencial zeta para CNC (verde) e CNC/Ag (azul) em pH 5. Os potenciais zeta médios para CNC e CNC/Ag foram $-54,6 \pm 13,9$ e $-54,0 \pm 6,81$ mV, respectivamente. Os dados representam a média de três medições.



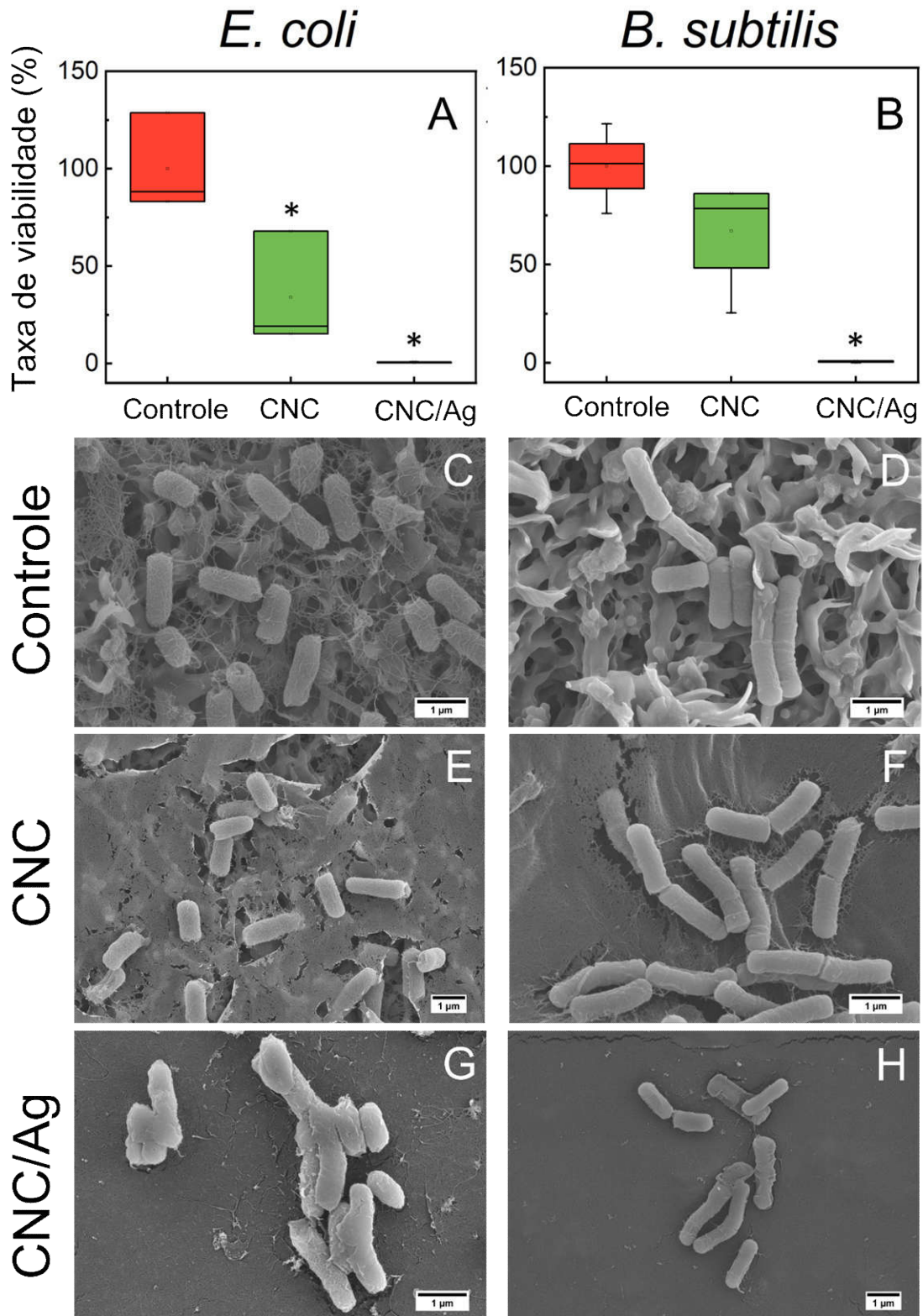
Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

4.4.2 Inativação de bactérias aderidas nas superfícies recobertas por CNC e CNC/Ag

A interação entre as bactérias e superfícies recobertas por CNCs e CNC/Ag foi avaliada através de um ensaio de interação direta. Suspensões de cada uma das bactérias utilizadas (*E. coli* e *B. subtilis*) foram incubadas diretamente sobre as superfícies recobertas obtidas pela deposição dos nanomateriais em filtros de PVDF. Como mostrado na Figura 33, superfícies recobertas por CNCs foram efetivas contra bactérias aderidas de ambas as cepas. A camada de CNCs apresentou taxas de inativação de 66,9 e 32,9% para *E. coli* e *B. subtilis*, respectivamente. A hipótese proposta seria que, sob contato direto com a superfície recoberta por CNCs, a camada de peptidoglicano presente na parede celular do *B. subtilis* atuaria como uma barreira física, dificultando o efeito de perfuração dos CNCs. Conforme descrito no primeiro capítulo, o mecanismo proposto para a toxicidade dos CNCs a bactérias aconteceria através de perfuração e perturbação da integridade física da membrana celular. Além disso, a atividade anti-bioincrustação observada para superfícies recobertas por CNCs também seria atribuída a esse mecanismo dependente de contato, sendo desencadeado pela adesão das bactérias à superfície.

Embora as superfícies recobertas com CNCs tenham mostrado propriedades antimicrobianas significativas, sua toxicidade foi melhorada através da funcionalização com AgNPs (CNC/Ag), conforme apresentado na Figura 33. Superfícies recobertas por CNC/Ag mostraram propriedades anti-bioincrustação melhoradas quando comparadas a superfícies recobertas por CNCs ou sem qualquer recobrimento. O número de bactérias viáveis aderidas de *E. coli* e *B. subtilis* foi reduzido em aproximadamente 99% após interação com os filtros recobertos por CNC/Ag, um acréscimo significativo em relação ao recobrimento de CNCs. Propriedades anti-bioincrustação similares foram observadas para superfícies recobertas por CNC/Ag contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, indicando que estes recobrimentos podem inativar efetivamente ambos os tipos de bactérias modelo (Xu *et al.*, 2020, 2013).

Figura 33 - Viabilidade de bactérias aderidas (A, *E. coli*; B, *B. subtilis*) após exposição às superfícies. Imagens de SEM mostrando células de *E. coli* e de *B. subtilis* após exposição a filtros PDVF (C, D), revestidos com CNC (E, F) e revestidos com CNC/Ag (G, H).



Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

Em trabalhos utilizando nanomateriais híbridos de CNCs e prata publicados previamente, Xu e colaboradores inseriram CNC/Ag na matriz polimérica de filmes finos a diferentes concentrações. Os filmes finos contendo CNC/Ag foram capazes de inativar 99,4% de células de *E. coli* aderidas após 3 h de exposição (Xu *et al.*, 2020). Em outro trabalho, membranas de álcool polivinílico com CNC/AgNPs embutidos demonstraram boa atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*. Após 24 h de exposição às membranas modificadas, 96,9% de células de *E. coli* e 88,2% de *S. aureus* aderidas foram inativadas (Xu *et al.*, 2013). Entretanto, a abordagem utilizada no presente trabalho apresenta um aspecto vantajoso quando comparado aos trabalhos citados: ao invés de embutir CNCs ou CNC/Ag em uma matriz polimérica, as superfícies recobertas possibilitam um contato direto do CNC/Ag com as bactérias. Abordagens baseadas nesse processo de embutimento podem resultar no aprisionamento do CNC/Ag no *bulk* da estrutura polimérica, dificultando um contato direto entre as bactérias e o nanomaterial. Como CNC/Ag está embutido na matriz polimérica, o compósito não se beneficia da toxicidade mediada por contato proveniente dos CNCs, uma vez que esse material não estaria totalmente disponível na superfície para um contato direto com os microrganismos. Por fim, as propriedades antimicrobianas do CNC/Ag refletiriam a toxicidade das AgNPs, com pouco ou nenhum envolvimento dos CNCs. Dessa forma, a estratégia de depositar CNCs ou CNC/Ag na superfície do material polimérico pode maximizar seu contato com as bactérias, resultando em propriedades anti-bioincrustação superiores (Faria, Perreault e Elimelech, 2018; Perreault *et al.*, 2015). O recobrimento de superfícies seria atrativo para materiais à base de CNC em virtude dessa habilidade de inativar bactérias através de uma rota dependente de contato, conforme observado no capítulo I.

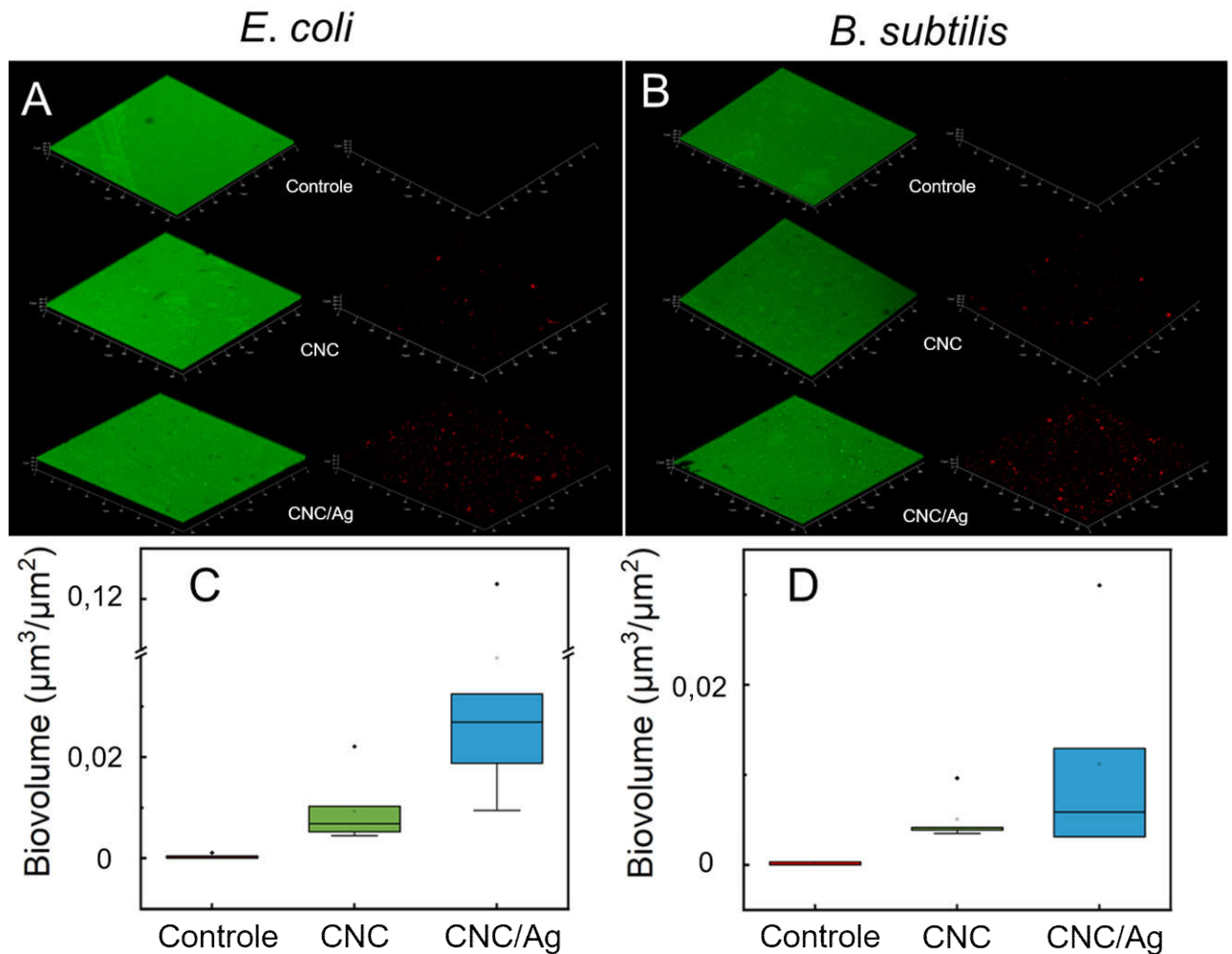
As características morfológicas das bactérias aderidas às superfícies recobertas com CNC e CNC/Ag foram avaliadas através de microscopia eletrônica de varredura (Figura 33). Ambas as cepas de bactérias aderidas aos filtros de PVDF apresentaram uma aparência de integridade celular, como observado nas Figura 33C e D. Em contraste, *E. coli* e *B. subtilis* aderidas às superfícies recobertas por CNC/Ag mostraram uma morfologia achatada e enrugada, como observado nas Figura 33G e H. A perda de integridade celular e morfologia pode ser decorrente da interação das bactérias com as extremidades pontiagudas dos CNCs. Esse morfologia dos nanocristais pode danificar as bactérias através do contato com, conforme também previamente observado para outro compósito contendo CNC (Tyagi *et al.*, 2019). Adicionalmente, a presença das AgNPs nas amostras recobertas por CNC/Ag aumenta os efeitos antimicrobianos, resultando em um efeito tóxico combinado de “ataque-ataque” nas

bactérias. As AgNPs presentes no CNC/Ag são solubilizadas a íons Ag^+ , que apresentam uma afinidade por diversas biomoléculas e organelas vitais, tais como DNA, peptídeos, enzimas e cofatores. Ao se ligar a estas bioestruturas, os íons Ag^+ perturbam o metabolismo, resultando em morte celular (Ouay, Le e Stellacci, 2015; Tyagi *et al.*, 2019). Portanto, a perda de integridade morfológica observada nas células expostas a CNC/Ag é provavelmente decorrente de uma combinação de estresse físico causado pelos CNCs e estresse químico criado pela ação dos íons prata nas proteínas de membrana celular e DNA.

Microscopia confocal foi utilizada para avaliar a formação de biofilme sobre a superfície original do filtro de PVDF e modificada com os recobrimentos de CNCs e CNC/Ag. Na Figura 34, são apresentadas projeções 3D representativas da formação de biofilme sobre os recobrimentos testados. Bactérias viáveis são mostradas em verde, enquanto bactérias não viáveis são representadas em vermelho. O biovolume médio foi calculado, com o auxílio do software *ImageJ*, a partir do compilado de imagens bidimensionais obtidas por CLSM em cada análise. O biovolume médio das células não-viáveis de *E. coli*, sobre os diferentes filtros foi de 0,00027, 0,00929, e 0,03958 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, para o PDVF original, recoberto com CNC e recoberto com CNC/Ag, respectivamente (Figura 34). Estes resultados indicam um aumento significativo na densidade de bactérias mortas para filtros cobertos com CNCs e CNC/Ag quando comparado com o filtro sem qualquer recobrimento (um aumento de 35 e 148 vezes, respectivamente). Para *B. subtilis*, resultados semelhantes foram observados: o biovolume médio de células mortas aumentou de 0,00013 para 0,00507 e 0,01122 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ para filtros recobertos por CNC e CNC/Ag, respectivamente (aumento de 39 e 87 vezes em comparação ao filtro original de PVDF).

Apesar do elevado biovolume de bactérias não-viáveis observado, um alto número de células viáveis (cor verde) está presente nas amostras recobertas por CNCs e CNC/Ag, como indicado nas Figura 34A e B. Uma vez que este ensaio foi realizado sob condições estáticas, é provável que a primeira camada de bactérias mortas e seus componentes e debris possam ter bloqueado em um certo grau a toxicidade das superfícies recobertas com CNC/Ag, possibilitando o crescimento bacteriano. Este efeito pode ser minimizado sob a presença condições não-estáticas, uma vez que o fluxo de líquido e uma melhor difusão de oxigênio podem maximizar a oxidação das AgNPs ancoradas no CNC/Ag, promovendo uma maior liberação de íons Ag^+ no meio, bem como possibilitar a mobilidade de bactérias aderidas e não aderidas (Paula, Hwang e Koo, 2020).

Figura 34 - Projeções 3D obtidas por CLSM representando a estrutura de biofilmes de *E. coli* (A) e *B. subtilis* (B) cultivados sobre as diferentes superfícies após incubação por 18 h. Biovolume médio de bactérias não viáveis para *E. coli* (C) e *B. subtilis* (D).



Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

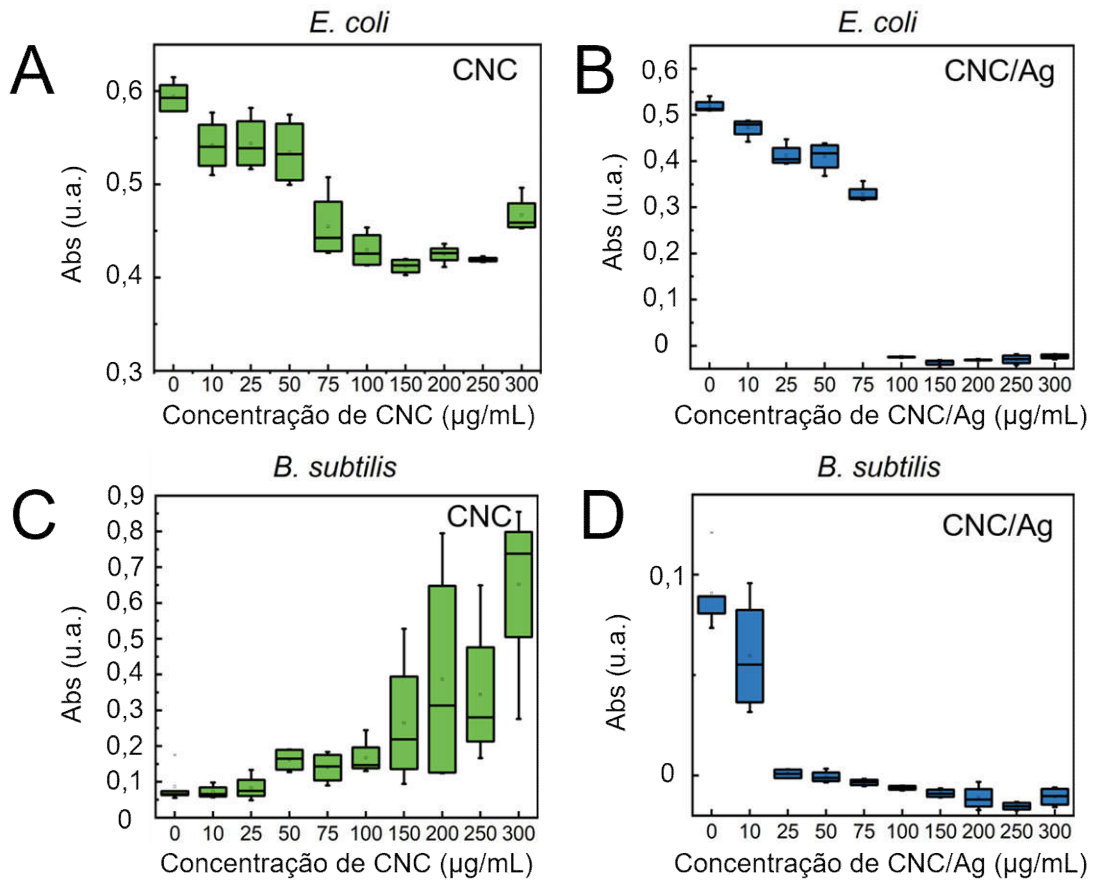
4.4.3 Atividade antibacteriana de suspensões de CNC e CNC/Ag em bactérias planctônicas

A fim de ampliar as possibilidades de aplicação de CNC/Ag, foi testada sua toxicidade frente a bactérias em suspensão. A Figura 35 mostra a toxicidade de CNCs e CNC/Ag frente à bactéria Gram-negativa *E. coli* e à Gram-positiva *B. subtilis*. A partir de uma concentração de CNC de 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, foi observada uma redução no crescimento de *E. coli*, sem resultar, entretanto, em uma inibição completa sob as concentrações testadas. Uma vez que os CNCs não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano nas concentrações testadas, não foi possível estimar o seu valor de CIM para *E. coli*. Por outro lado, CNC/Ag mostrou toxicidade

para *E. coli* em todas as concentrações testadas, sendo capaz de inibir qualquer crescimento bacteriano em concentrações a partir de 100 µg/mL. Estes resultados indicam uma melhoria no efeito antimicrobiano para CNC/Ag em comparação aos CNCs (Figura 35A e B).

Conforme observado na Figura 35C, a presença de CNCs parece promover o crescimento de *B. subtilis*, uma vez que os valores de absorvância aumentam com o aumento da concentração de CNCs. É provável que os CNCs promovam um processo de esporulação em *B. subtilis*, através da criação de um ambiente hostil para estas bactérias. Os esporos formados decorrentes desse processo formam largos agregados (alguns até visíveis a olho nu, como pode ser visto na Figura 36), o que aumenta a densidade óptica da suspensão. Este fenômeno se torna mais pronunciado com o aumento da concentração de CNCs. A produção de aglomerados contendo esporos é um comportamento previamente descrito para *B. subtilis* (Riley *et al.*, 2021). Apesar da falta de toxicidade dos CNCs, CNC/Ag foi capaz de suprimir o crescimento de *B. subtilis* em concentrações a partir de 25 µg/mL (Figura 35D). As células de *E. coli* apresentaram um valor de CIM superior àquele observado para *B. subtilis* expostos a CNC/Ag. O nanomaterial híbrido apresentou uma CIM de 25 µg/mL para *B. subtilis*, valor 4 vezes menor do que o observado para *E. coli* em suspensão (100 µg/mL). Estes resultados indicam uma maior susceptibilidade do *B. subtilis* ao CNC/Ag sob as condições testadas. Spagnol e colaboradores observaram um padrão semelhante para a CIM de *nanowhiskers* de celulose modificados com AgNPs, enquanto a concentração obtida para *E. coli* foi de 125 µg/mL, o valor de CIM para *B. subtilis* foi de 15,6 µg/mL (Spagnol *et al.*, 2018). Propriedades antimicrobianas similares também foram observadas para outros materiais de carbono modificados com prata, incluindo estrutura metalôrgânicas (*Metal Organic Framework - MOF*) (Firouzjaei, Shamsabadi, Aktij, *et al.*, 2018; Firouzjaei, Shamsabadi, Sharifian Gh., *et al.*, 2018; Zirehpour *et al.*, 2017) e óxido de grafeno (Faria *et al.*, 2017; Faria, de *et al.*, 2017; Faria, de, Perreault, Shaulsky, Arias Chavez, Laura H., *et al.*, 2015; Moraes *et al.*, 2015).

Figura 35 - Absorbância (OD600) de suspensões de *E. coli* expostas a CNCs (A) e CNC/Ag (B). Absorbância de suspensões de *B. subtilis* incubados com CNCs (C) e CNC/Ag (D).



Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

Figura 36 - Poços de microplacas com concentrações crescentes de CNCs da esquerda para a direita. Em concentrações mais altas de CNCs, um padrão de esporulação para *B. subtilis* é observado.



Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

Durante a análise de CBM, não foi observado crescimento de colônias nas placas de ágar LB para nenhuma das bactérias incubadas com CNC/Ag em concentrações iguais ou maiores do que as respectivas CIMs. Este resultado implica em um valor de CBM equivalente à CIM para cada cepa bacteriana (Tabela 3). Uma razão CBM/CIM igual a um indica efeito bacterida do CNC/Ag em suspensão. Para Spagnol e colaboradores, razões CBM/CIM similares também foram encontradas para a interação de *E. coli* e *B. subtilis* com materiais híbridos a base de prata (Spagnol *et al.*, 2018). Valores de CBM não puderam ser obtidos para o CNC apenas, uma vez que não foi possível determinar a CIM deste material para *E. coli* e *B. subtilis*.

Tabela 3 - CIM e CBM para CNC e CNC/Ag testados em *E. coli* e *B. subtilis*.

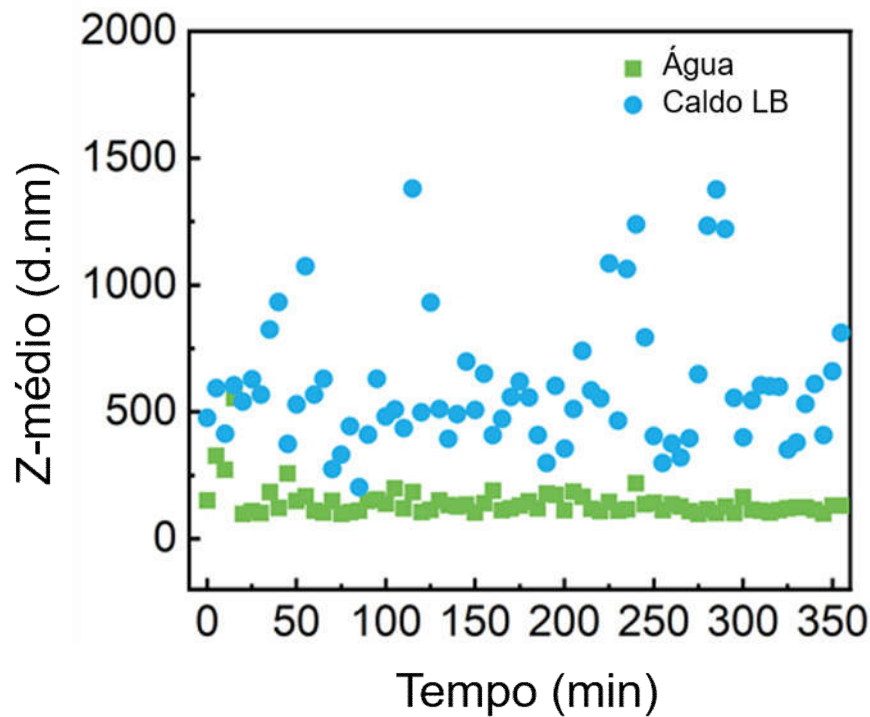
Cepa	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		CBM ($\mu\text{g/mL}$)		CBM/CIM
	CNC	CNC/Ag	CNC	CNC/Ag	CNC/Ag
<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	-	100	-	100	1
<i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)	-	25	-	25	1

Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

Para confirmar a estabilidade coloidal de CNC/Ag, o diâmetro hidrodinâmico do nanomaterial disperso em caldo LB (meio utilizado nos ensaios antimicrobianos) e água deionizada foi avaliado por DLS durante 6 h (Figura 37). Em virtude da natureza não-esférica dos CNCs, seria esperado que o *Z-average value* obtido através de DLS não correspondesse necessariamente aos valores de comprimento ou largura observados para CNC/Ag. Em vez disso, este valor corresponderia ao “tamanho aparente” de uma esfera equivalente com o mesmo coeficiente difusional do CNC/Ag disperso. Apesar destas limitações, a análise de DLS pode fornecer informações úteis acerca do surgimento de aglomerados ou agregados na solução (Jakubek *et al.*, 2018). Como mostrado na Figura 37, os valores de tamanho hidrodinâmico permaneceram estáveis durante a análise, com uma leve tendência de aumento para CNC/Ag disperso em caldo LB, em comparação ao nanomaterial disperso em água. O diâmetro hidrodinâmico obtido para CNC/Ag disperso em caldo LB ($599,6 \pm 262,2$ nm) pode

ser um indicativo da presença de partículas fracamente ligadas, uma vez que este valor é superior ao obtido para CNC/Ag disperso em água ($143 \pm 64,4$ nm).

Figura 37 - Diâmetro hidrodinâmico de CNC/Ag (300 $\mu\text{g/mL}$) disperso em caldo LB e água deionizada ao longo de 6 h de medições de DLS.

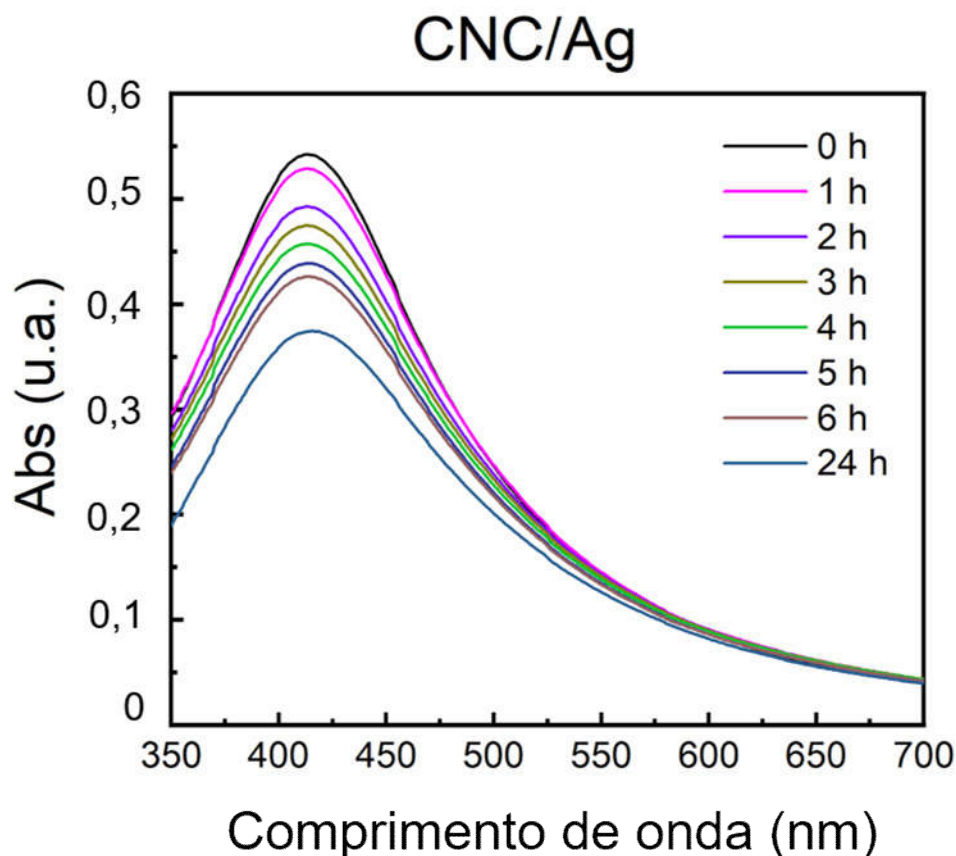


Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

Para avaliar a possível ocorrência de aglomeração severa, a estabilidade coloidal do CNC/Ag também foi analisada através do monitoramento da banda de ressonância plasmônica de superfície (SPR) das AgNPs, próxima ao comprimento de onda de 400 nm, por espectroscopia UV-Vis. Para isto, dados espectroscópicos do CNC/Ag suspenso em caldo LB foram coletados em diferentes intervalos de tempo (Figura 38). Os espectros de absorvância de CNC/Ag disperso a uma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ foram obtidos a cada hora durante 6 h e após 24 h. O decréscimo na intensidade e alargamento da banda próxima a 400 nm para o CNC/Ag disperso em caldo LB sugerem a possível formação de partículas fracamente aderidas (Argentiere *et al.*, 2016; Tejamaya *et al.*, 2012). A redução da intensidade da banda de SPR por si só, poderia indicar um processo de dissolução das AgNPs (Tejamaya *et al.*, 2012). Apesar do decréscimo na intensidade desta banda com o passar do tempo, não foi observado o surgimento de bandas de absorvância adicionais acima de 600 nm, o que

indicaria ocorrência de aglomeração severa (Argentiere *et al.*, 2016; Tejamaya *et al.*, 2012). Portanto, embora possa ocorrer alguns processos de interação partícula-partícula, indicadores de aglomeração severa em suspensão não foram observados através dos ensaios utilizados.

Figura 38 - Espectros UV-Vis de CNC/Ag disperso em caldo LB a uma concentração de 100 µg/mL. Os espectros foram adquiridos a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 h de incubação.



Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

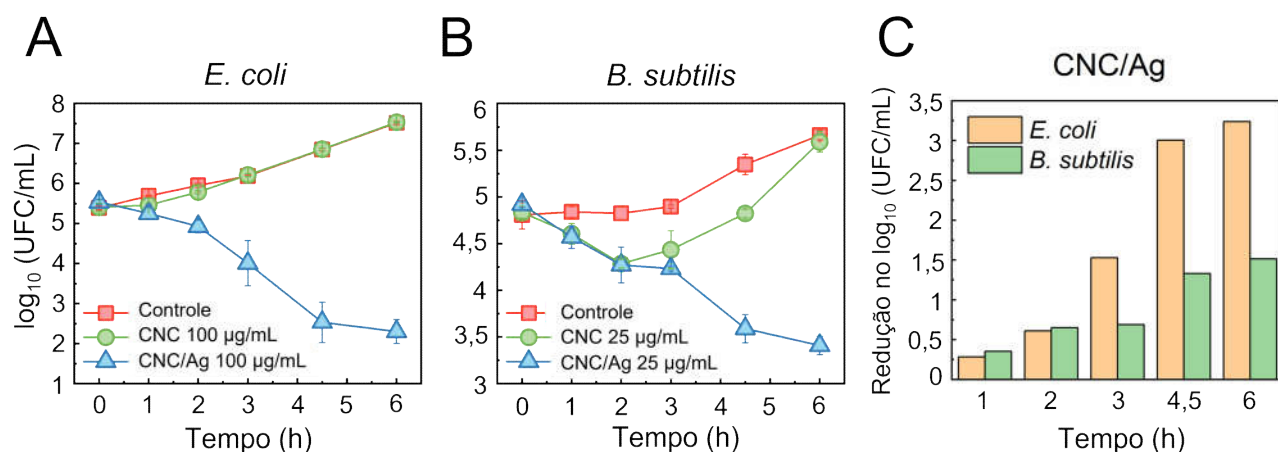
No presente trabalho, a toxicidade das AgNPs isoladas não foi investigada. Entretanto, trabalhos anteriores mostraram uma propriedade antimicrobiana melhorada para matérias híbridas de CNC/Ag quando comparado às AgNPs apenas (Shi *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). Ensaios de contagem de bactérias viáveis em placa indicaram uma melhora na atividade antibacteriana para polidopamina(PD)-CNC-Ag em comparação às AgNPs: PD-CNC-Ag apresentou CIM de 8 µg/mL contra *B. subtilis*, enquanto AgNPs tiveram CIM de 32 µg/mL para a mesma cepa (Shi *et al.*, 2015). Além disso, nanowhiskers de celulose modificados com AgNPs também apresentaram valores de CIM muito menores para *E. coli*

em comparação com AgNPs comerciais (Wang *et al.*, 2016). Esta melhora na toxicidade para CNC-Ag foi atribuída ao ancoramento das AgNPs na superfície dos CNCs, prevenindo perdas de propriedades antimicrobianas decorrentes da aglomeração das partículas (Shi *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).

4.4.4 Cinética de atividade antibacteriana de CNC e CNC/Ag em bactérias planctônicas

Experimentos foram realizados para investigar a cinética de crescimento bacteriano sob a presença de CNCs e CNC/Ag. Estes ensaios foram essenciais para analisar a interação entre o agente antimicrobiano e as bactérias e observar a influência do tempo de exposição na atividade antibacteriana (Balouiri, Sadiki e Ibsouda, 2016). Cada bactéria modelo foi incubada com CNC/Ag em sua respectiva CIM, repetindo também a mesma concentração para CNC. Desta forma, CNCs e CNC/Ag foram incubados a 100 µg/mL para *E. coli* e 25 µg/mL para *B. subtilis* durante um período de 6 h. Aliquotas foram coletadas em seis diferentes momentos da incubação para determinação do número de células viáveis através de contagem em placa (Figura 39) (Balouiri, Sadiki e Ibsouda, 2016; Konaté *et al.*, 2012).

Figura 39 - Cinética de crescimento de *E. coli* (A) e *B. subtilis* (B) expostos a CNC ou CNC/Ag. (C) Valor da redução de log (UFC/mL) após exposição de células de *E. coli* e *B. subtilis* a CNC/Ag.



Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

E. coli exposta aos CNCs apresentou crescimento similar à suspensão controle (sem nanomaterial), sugerindo que os CNCs não apresentaram toxicidade às bactérias sob as

condições avaliadas (Figura 39A). Por outro lado, uma significativa redução de 1,5 no log (UFC/mL) ocorreu após a incubação de *E. coli* com CNC/Ag, indicando um efeito bactericida do nanomaterial sobre este microrganismo. Também foi observado um decréscimo similar no número de células viáveis de *B. subtilis* após a exposição aos CNCs e CNC/Ag durante às duas primeiras horas de incubação (Figura 39B). Entretanto, após esse período, as bactérias voltaram a crescer de forma quase exponencial, alcançando valores similares ao controle ao final do período de incubação. Por outro lado, a viabilidade das células de *B. subtilis* diminuiu sistematicamente ao longo da incubação com CNC/Ag. Uma redução de 1,5 no log (UFC/mL), correspondente a uma diminuição de cerca de 90% no número de bactérias viáveis, foi detectada para *B. subtilis* exposto a CNC/Ag, demonstrando o efeito bactericida promovido pelo nanomaterial híbrido.

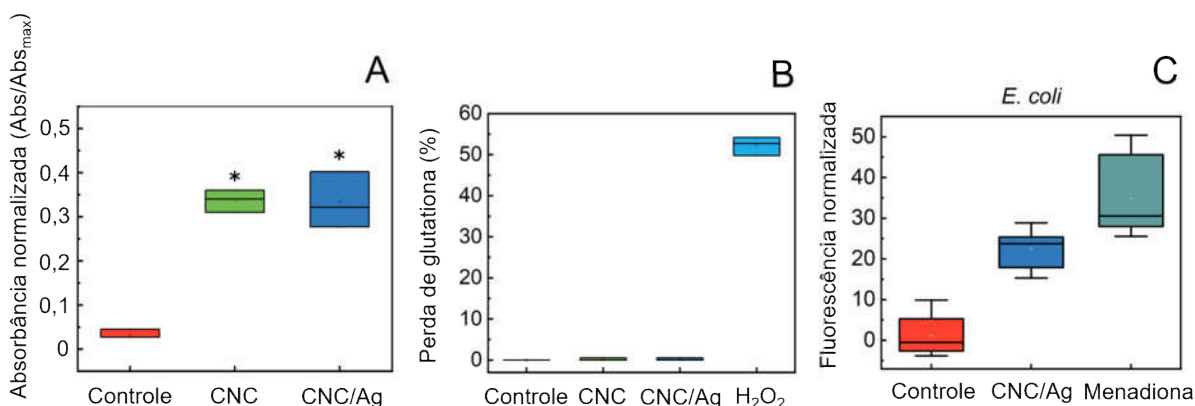
A Figura 39C mostra uma redução de log (UFC/mL) para *E. coli* e *B. subtilis* após a exposição a CNC/Ag durante o ensaio de cinética de inativação. Um decréscimo significativo de 1,5 no log (UFC/mL) é observado para *E. coli* após 3h de exposição a CNC/Ag. Além disso, a redução no log (UFC/mL) aumenta com o tempo de exposição das bactérias ao material híbrido. Para *B. subtilis*, uma tendência semelhante na redução do log (UFC/mL) também é observada. Entretanto, é possível notar uma redução mais drástica no log (UFC/mL) para *B. subtilis* do que para *E. coli*. Após 6 h de interação com CNC/Ag, as suspensões de *E. coli* mostraram uma redução de 3,0 no log (UFC/mL), diferente do observado para *B. subtilis*, que mostraram uma redução no log UFC próxima a 1,5. Este resultado indica que CNC/Ag é capaz de inativar *E. coli* mais rapidamente do que *B. subtilis* em concentrações equivalentes a CIM. Diferenças intrínsecas na composição da parede celular e estrutura podem explicar as diferenças nas propriedades antimicrobianas entre *E. coli* e *B. subtilis*. A camada mais rígida e espessa de peptídeoglicanos negativamente carregados pode dificultar a difusão de íons prata através da parede celular (Dakal *et al.*, 2016), resultando em uma menor susceptibilidade aos efeitos da prata para a Gram-positiva *B. subtilis* em comparação a Gram-negativa *E. coli*. Embora diversos estudos tenham tentado avaliar a atividade antibacteriana de materiais baseados em CNC/Ag (Shi *et al.*, 2015; Spagnol *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2016), ainda há uma falta de compreensão no que diz respeito a cinética da interação entre bactérias e CNC/Ag. Este trabalho pode então proporcionar uma primeira avaliação sistemática da atividade antibacteriana deste material, contemplando aspectos como CIM, CBM e toxicidade dependente de tempo.

4.4.5 *Mecanismos de ação relacionados a toxicidade de CNC/Ag contra bactérias*

Para avaliar a capacidade de inativação de bactérias através de mecanismos físicos de estresse à membrana, vesículas fosfolipídicas contendo corante foram utilizadas para mimetizar a exposição de membranas celulares a CNC/Ag. A liberação de corante encapsulado (laranja de acridina) mediante o contato do nanomaterial com as vesículas lipídicas é um forte indicativo da capacidade desse material de perfurar membranas celulares e perturbar a integridade física de bicamadas fosfolipídicas. A presença de perfurações afeta a troca de nutrientes com o ambiente, causando perda de conteúdo intracelular e facilitando a entrada de íons Ag^+ no processo de exposição a CNC/Ag.

A Figura 40A mostra um aumento relativo nas intensidades de absorvância devido ao extravasamento de corante promovido pela interação dos CNCs e CNC/Ag com as vesículas fosfolipídicas. Esses aumentos de intensidade de absorvância relativa foram calculados pela divisão da absorvância de cada tratamento pelo valor máximo de absorvância obtido após o rompimento das vesículas com uma solução de surfactante (lauril sulfato de sódio – SLS, 0,1 g/mL). Os resultados das amostras de controle (vesículas lipídicas em água deionizada) mostram um valor muito baixo de absorvância relativa ao final de 3 h de experimento, indicando um efluxo insignificativo de corante através das vesículas nesse período. Por outro lado, maiores intensidades de absorvância para vesículas tratadas com CNCs e CNC/Ag indicam um extravasamento significativo de corante e danos à estrutura das vesículas fosfolipídicas (Figura 40A). Valores similares de absorvância relativa foram obtidos para ambos os nanomateriais: $0,33 \pm 0,02$ para CNC e $0,33 \pm 0,06$ para CNC/Ag. Estes resultados sugerem que CNCs e CNC/Ag apresentam habilidades equivalentes de desestabilização de bicamadas lipídicas em membranas celulares. Este resultado seria esperado, uma vez que ambos os materiais compartilham da mesma morfologia pontiaguda (Figura 28 e Figura 25B).

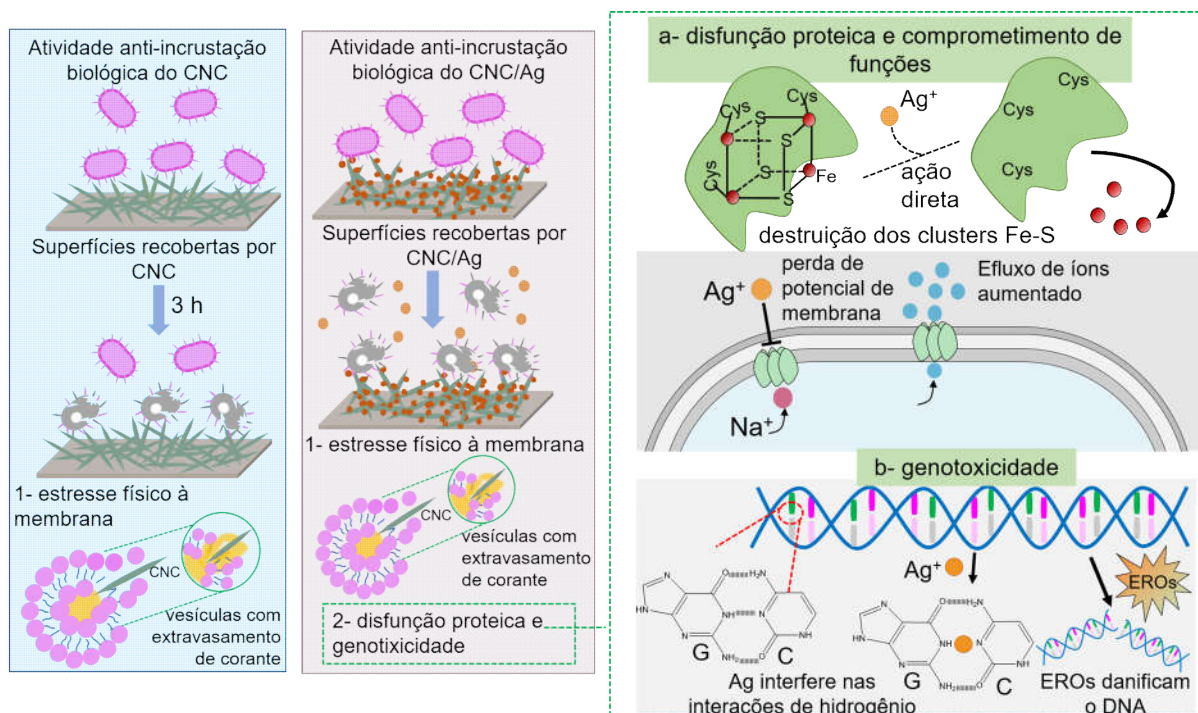
Figura 40 - (A) Absorbância relativa a 500 nm de suspensão de vesículas após interação com os nanomateriais (B) Oxidação da GSH por CNCs e CNC/Ag após 3 h de contato. (C) Quantificação de EROs por fluorescência de bactérias expostas a CNC/Ag e menadiona.



Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

Dessa forma, é possível inferir que a estrutura rígida, cristalina e pontiaguda dos CNCs e CNC/Ag é responsável pelo dano mediado por contato promovido por estes nanomateriais. Com base nos resultados expostos na Figura 40A, AgNPs aderidas nos CNCs aparentam não contribuir no mecanismo de estresse físico às membranas celulares. Essa observação sugere que, caso as AgNPs presentes no CNC/Ag interajam com os constituintes da membrana, essas interações não resultam em mudanças significativas na permeabilidade das membranas celulares sob as condições testadas. Embora as AgNPs presentes no CNC/Ag possam não comprometer a permeabilidade celular, as partículas metálicas poderiam ainda afetar a funcionalidade das membranas por se ligar às proteínas de transporte, afetando a absorção celular e o efluxo de íons essenciais (Lemire, Harrison e Turner, 2013). Além disso, estas interações proteína-Ag podem resultar em disfunção membranar, interrupção do transporte de elétrons e perda de atividade enzimática. A entrada de íons metálicos também pode explicar o aumento da toxicidade do CNC/Ag em comparação com CNCs. Enquanto CNCs perfuram as membranas, íons Ag⁺ podem rapidamente interagir e danificar ácidos nucleicos, interferindo nos processos metabólicos necessários para a sobrevivência celular (Lemire, Harrison e Turner, 2013), como ilustrado na Figura 41.

Figura 41 - Ilustração demonstrando o mecanismo pelo qual as superfícies revestidas com CNCs e CNC/Ag inativam as células bacterianas aderidas.



Adaptado de Noronha *et al.*, 2022.

O ensaio com GSH avaliou a habilidade de CNCs e CNC/Ag de induzir o processo de oxidação (Hellack *et al.*, 2017). A geração de EROs, seja por oxidação direta ou indireta, é um mecanismo de toxicidade comumente desencadeado por nanomateriais (Ouay, Le e Stellacci, 2015; Sharifi *et al.*, 2012). Desta forma, a oxidação de GSH foi realizada para investigação das propriedades oxidativas dos CNCs e CNC/Ag. Os resultados mostraram aumentos negligenciáveis na oxidação de GSH para CNCs e CNC/Ag (0,16 e 0,32%, respectivamente) em comparação ao grupo controle (Figura 40B). Por outro lado, sob a presença de um forte agente oxidativo como H₂O₂ (10 mM), a oxidação de GSH chegou a 52% após 3 h de interação.

A presença de EROs dentro das bactérias foi também investigada através da utilização de H₂DCFDA (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína,) utilizando *E. coli* como organismo modelo. Sob a presença de EROs no citoplasma celular, H₂DCFDA é transformado em DCF, um composto altamente fluorescente que absorve e emite luz a 493/520 nm, respectivamente. A magnitude do sinal de fluorescência gerado pelo DCF pode ser relacionada ao nível de EROs nas células bacterianas. Os resultados obtidos neste ensaio então dispostos na Figura 40C. Um acréscimo significativo no sinal de fluorescência a 520 nm

foi observado para *E. coli* exposto a CNC/Ag (100 µg/mL). As amostras de CNC/Ag tiveram valores médios de fluorescência 22 vezes maiores que o controle negativo. Este resultado indica que CNC/Ag é capaz de induzir a acumulação de EROs dentro das bactérias, corroborando com trabalhos anteriores que relataram mecanismos de estresse oxidativo para materiais contendo prata (Ouay, Le e Stellacci, 2015). Conforme abordado no capítulo 1, CNCs suspensos não foram capazes de promover oxidação de H₂DCFDA em DCF.

Embora o ensaio com GSH tenha mostrado que CNC/Ag não promove um processo de oxidação direta, a metodologia utilizando H₂DCFDA confirma uma acumulação de EROs dentro das células expostas ao nanomaterial. Essa acumulação pode causar danos severos a organelas, proteínas e ácidos nucleicos, como ilustrado na Figura 41. Além desse mecanismo indireto de oxidação, é importante mencionar que os íons Ag⁺ podem ainda se ligar a grupos funcionais específicos de proteínas e enzimas, causando processos localizados de oxidação nessas biomoléculas essenciais (Ouay, Le e Stellacci, 2015; Qing *et al.*, 2018). Os íons prata podem participar em reações redox, se ligando seletivamente a átomos doadores de elétrons, tais como oxigênio, nitrogênio e enxofre. A presença abundante de íons Ag⁺ pode ainda provocar a substituição de cofatores metálicos em proteínas, interferindo em seu correto dobramento, estrutura tridimensional e função, desencadeando processos de colapso metabólico e morte celular (Lemire, Harrison e Turner, 2013).

4.5 Conclusão

Este estudo demonstrou a deposição de AgNPs na superfície de CNCs para melhoria de propriedades antimicrobianas e anti-incrustação biológica. A ancoragem de AgNPs em CNCs (CNC/Ag) foi realizada de forma *in situ* utilizando boroidreto de sódio. AgNPs ancoradas apresentaram um diâmetro médio de 10,3 nm e boa distribuição na superfície dos CNCs. Os resultados obtidos mostraram que a funcionalização com AgNPs melhorou de forma significativa as propriedades anti-incrustação biológicas dos CNCs. Por exemplo, a habilidade de superfícies recobertas com CNCs inativarem bactérias (Gram-negativa e Gram-positiva) aumentou de 33 a 65% para mais de 99% após a modificação com AgNPs. Desta forma, CNC/Ag mostrou excelente potencial em aplicações anti-bioincrustação em medicina e engenharia como recobrimento antimicrobiano. CNC/Ag também mostrou alta toxicidade a células planctônicas de *E. coli* e *B. subtilis*, confirmando a capacidade do material de inativar bactérias em suspensão antes mesmo da adesão à superfície. As concentrações inibitórias

mínimas para *B. subtilis* e *E. coli* foram de 25 e 100 µg/mL, respectivamente. Ensaios de cinética de inativação mostraram que CNC/Ag inativou células planctônicas da Gram-negativa *E. coli* mais rapidamente que a Gram-positiva *B. subtilis*, revelando que a cinética antibacteriana de CNC/Ag é afetada pela estrutura e composição da parede celular bacteriana. Baixa toxicidade foi observada para CNCs contra células planctônicas para ambos os microrganismos. Ensaios de extravasamento de corante revelaram que CNCs e CNC/Ag promoveram o rompimento de bicamadas lipídicas e podem inativar bactérias por mecanismos físicos. Os experimentos com GSH sugeriram que nem CNC nem CNC/Ag foram capazes de induzir estresse oxidativo através da produção direta de EROs. Entretanto, foi observada a acumulação de EROs dentro das bactérias expostas a CNC/Ag durante 3 h. Estes resultados indicam que CNC/Ag pode não oxidar as células por geração direta de EROs, porém é capaz de interferir nos mecanismos de antioxidação celulares usados para manter os níveis de EROs baixos no citoplasma. Desta forma, o mecanismo de ação proposto para CNC/Ag combinaria um estresse físico à membrana promovido pela estrutura pontiaguda do CNC e o rompimento de processos metabólicos vitais causados pelas AgNPs ancoradas, em uma estratégia de “ataque-ataque”.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nas análises realizadas no presente trabalho, foi possível observar um decréscimo na viabilidade bacteriana decorrente da interação com CNCs, seja em sua forma dispersa ou como revestimento disposto sob uma superfície. Para dispersões de CNCs, foi observado um efeito significativo na inibição do crescimento microbiano a partir de uma concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do nanomaterial. Já para superfícies revestidas com os CNCs, uma redução de 90% na taxa de viabilidade bacteriana pôde ser observada. Os ensaios adicionais realizados indicaram o estresse mediado por contato como provável mecanismo de toxicidade, uma vez que o nanomaterial foi capaz de causar danos físicos a bactérias e vesículas lipídicas sem que uma capacidade oxidativa pudesse ser observada. A funcionalização de membranas de filtração com CNCs foi também capaz de prover atividade antimicrobiana, conforme observado nos ensaios realizados em sistema de filtração de escala de bancada, onde uma redução de 90% da viabilidade bacteriana foi atingida. A melhoria dessa propriedade não resultou em decréscimo das propriedades de transporte. Por fim, a combinação dos CNCs com AgNPs resultou em melhoria das propriedades antimicrobianas e anti-incrustação biológica, uma vez que as superfícies recobertas com o nanomaterial híbrido passaram a apresentar uma taxa de inativação de bactérias superior a 99%. A avaliação de outros parâmetros de atividade antimicrobiana tais como CIM e CBM indicaram ainda uma atividade bactericida do nanomaterial híbrido em concentrações superiores a 25 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para *B. subtilis* e *E. coli*, respectivamente. Ensaio para avaliação da produção de EROs e de rompimento de vesículas lipídicas demonstraram um mecanismo de ação de “ataque-ataque” para o nanomaterial híbrido: enquanto os nanocristais causariam um estresse físico às estruturas bacterianas em virtude de sua morfologia, os íons Ag^+ provenientes das AgNPs ancoradas interfeririam nos processos metabólicos vitais desses organismos.

Esforços adicionais serão necessários para investigação da possível correlação entre a abundância relativa de extremidades pontiagudas em materiais à base de CNCs e suas propriedades antimicrobianas. Estudos futuros que busquem uma melhor compreensão das forças motrizes e da natureza química da interação entre CNCs e os componentes das membranas e paredes celulares seriam de grande importância para a completa elucidação dos mecanismos envolvidos. Ferramentas como a microscopia de força atômica e a microscopia confocal em sistema de fluxo poderiam auxiliar no entendimento das forças de interação entre nanomateriais e bactérias, bem como na capacidade de adesão de bactérias em superfícies

recobertas por filmes dos diferentes materiais, respectivamente. É fundamental também investigar o potencial ecotoxicológico dos materiais, para garantir que os ganhos em propriedades observados não sejam superados por eventuais efeitos nocivos aos ecossistemas que resíduos dos nanomateriais possam provocar.

REFERÊNCIAS

- ABITBOL, T. *et al.* Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 39, p. 76–88, jun. 2016.
- ADLHART, C. *et al.* Surface modifications for antimicrobial effects in the healthcare setting: a critical overview. **Journal of Hospital Infection**, v. 99, n. 3, p. 239–249, jul. 2018.
- AHONEN, M. *et al.* Proactive Approach for Safe Use of Antimicrobial Coatings in Healthcare Settings: Opinion of the COST Action Network AMiCI. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 4, p. 366, mar. 2017.
- AL-JUMAILI, A. *et al.* Review on the Antimicrobial Properties of Carbon Nanostructures. **Materials**, v. 10, n. 9, p. 1066, 11 set. 2017.
- ALHARTHI, F. A. *et al.* Facile one-pot green synthesis of Ag–ZnO Nanocomposites using potato peeland their Ag concentration dependent photocatalytic properties. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–14, dez. 2020.
- ALVEZ, A. *et al.* At the crossroads: can desalination be a suitable public policy solution to address water scarcity in Chile’s mining zones? **Journal of Environmental Management**, v. 258, p. 110039, mar. 2020.
- ANTONY, A. *et al.* Assessing the oxidative degradation of polyamide reverse osmosis membrane—Accelerated ageing with hypochlorite exposure. **Journal of Membrane Science**, v. 347, n. 1–2, p. 159–164, 1 fev. 2010.
- ARGENTIERE, S. *et al.* Silver nanoparticles in complex biological media: assessment of colloidal stability and protein corona formation. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 18, n. 8, p. 1–13, 2016.
- ASEMPOUR, F. *et al.* Synthesis and characterization of novel Cellulose Nanocrystals-based Thin Film Nanocomposite membranes for reverse osmosis applications. **Desalination**, v. 439, p. 179–187, ago. 2018.
- AZIZ, T. *et al.* Cellulose Nanocrystals Applications in Health, Medicine and Catalysis. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 29, n. 7, p. 2062–2071, 21 jul. 2021.
- BAI, L. *et al.* Incorporation of Cellulose Nanocrystals (CNCs) into the Polyamide Layer of Thin-Film Composite (TFC) Nanofiltration Membranes for Enhanced Separation Performance and Antifouling Properties. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 19, p. 11178–11187, 2 out. 2018.
- BAI, L. *et al.* Fabrication and characterization of thin-film composite (TFC) nanofiltration membranes incorporated with cellulose nanocrystals (CNCs) for enhanced desalination performance and dye removal. **Chemical Engineering Journal**, v. 358, n. August 2018, p. 1519–1528, 2019.
- BAKER, J. S.; DUDLEY, L. Y. Biofouling in membrane systems — A review. **Desalination**, v. 118, n. 1–3, p. 81–89, set. 1998.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.
- BAR-ZEEV, E. *et al.* Impaired Performance of Pressure-Retarded Osmosis due to Irreversible

- Biofouling. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 21, p. 13050–13058, 2015.
- BARRIOS, A. C. *et al.* Structure–Property–Toxicity Relationships of Graphene Oxide: Role of Surface Chemistry on the Mechanisms of Interaction with Bacteria. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 24, p. 14679–14687, dez. 2019.
- CAMARGOS, C. H. M.; REZENDE, C. A. Structure–Property Relationships of Cellulose Nanocrystals and Nanofibrils: Implications for the Design and Performance of Nanocomposites and All-Nanocellulose Systems. **ACS Applied Nano Materials**, v. 4, n. 10, p. 10505–10518, 22 out. 2021.
- CASCHERA, D. *et al.* Green approach for the fabrication of silver-oxidized cellulose nanocomposite with antibacterial properties. **Cellulose**, v. 27, n. 14, p. 8059–8073, set. 2020.
- CHEN, K. L. *et al.* The development of membrane fouling in full-scale RO processes. **Journal of Membrane Science**, v. 232, n. 1–2, p. 63–72, mar. 2004.
- CHENG, G. *et al.* Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. **Biomaterials**, v. 28, n. 29, p. 4192–4199, out. 2007.
- CHENG, W. *et al.* Graphene Oxide Functionalized Membranes: The Importance of Nanosheet Surface Exposure for Biofouling Resistance. **Environmental Science & Technology**, p. acs.est.9b05335, 2019.
- CLOUTIER, M.; MANTOVANI, D.; ROSEI, F. Antibacterial Coatings: Challenges, Perspectives, and Opportunities. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 637–652, nov. 2015.
- COLMAN, B. P. *et al.* Emerging Contaminant or an Old Toxin in Disguise? Silver Nanoparticle Impacts on Ecosystems. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 9, p. 5229–5236, 6 maio 2014.
- COSERI, S. *et al.* One-shot carboxylation of microcrystalline cellulose in the presence of nitroxyl radicals and sodium periodate. **RSC Advances**, v. 5, n. 104, p. 85889–85897, 2015.
- CRIDDLE, D. N. *et al.* Menadione-induced Reactive Oxygen Species Generation via Redox Cycling Promotes Apoptosis of Murine Pancreatic Acinar Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 40485–40492, dez. 2006.
- CRUZ-SILVA, R. *et al.* Nanocomposite desalination membranes made of aromatic polyamide with cellulose nanofibers: synthesis, performance, and water diffusion study. **Nanoscale**, v. 12, n. 38, p. 19628–19637, 2020.
- DAKAL, T. C. *et al.* Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 16 nov. 2016.
- DAS, R. K. *et al.* Biological synthesis of metallic nanoparticles: plants, animals and microbial aspects. **Nanotechnology for Environmental Engineering**, v. 2, n. 1, p. 18, 9 dez. 2017.
- DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 114–122, fev. 2003.
- DING, S.-Y.; HIMMEL, M. E. The Maize Primary Cell Wall Microfibril: A New Model Derived from Direct Visualization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 597–606, fev. 2006.
- DRESZER, C. *et al.* Hydraulic resistance of biofilms. **Journal of Membrane Science**, v. 429,

p. 436–447, fev. 2013.

DREYER, D. R. *et al.* The chemistry of graphene oxide. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, n. 1, p. 228–240, 2010.

DU, L. *et al.* Biological toxicity of cellulose nanocrystals (CNCs) against the luxCDABE-based bioluminescent bioreporter *Escherichia coli* 652T7. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 10, p. 2049–2053, 2015.

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

ECKELMAN, M. J. *et al.* New Perspectives on Nanomaterial Aquatic Ecotoxicity: Production Impacts Exceed Direct Exposure Impacts for Carbon Nanotubes. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 5, p. 2902–2910, 6 mar. 2012.

EL-SAMAHY, M. A. *et al.* Synthesis of hybrid paper sheets with enhanced air barrier and antimicrobial properties for food packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 212–219, jul. 2017.

ELIMELECH, M. The global challenge for adequate and safe water. **Journal of Water Supply: Research and Technology - Aqua**, v. 55, n. 1, p. 3–10, 1 fev. 2006.

ERROKH, A. *et al.* Hybrid nanocellulose decorated with silver nanoparticles as reinforcing filler with antibacterial properties. **Materials Science and Engineering: C**, v. 105, p. 110044, dez. 2019.

ESPINO-PÉREZ, E. *et al.* Green Process for Chemical Functionalization of Nanocellulose with Carboxylic Acids. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 12, p. 4551–4560, dez. 2014.

FAHEY, R. C. *et al.* Occurrence of glutathione in bacteria. **Journal of bacteriology**, v. 133, n. 3, p. 1126–9, mar. 1978.

FAN, L. *et al.* Cellulose nanocrystals/silver nanoparticles: In-situ preparation and application in PVA films. **Holzforschung**, v. 74, n. 5, p. 523–528, maio 2019.

FARIA, A. F. *et al.* Thin-film composite forward osmosis membranes functionalized with graphene oxide–silver nanocomposites for biofouling control. **Journal of Membrane Science**, v. 525, p. 146–156, mar. 2017.

FARIA, A. F. DE *et al.* Eco-friendly decoration of graphene oxide with biogenic silver nanoparticles: antibacterial and antibiofilm activity. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 2, p. 2110, 11 fev. 2014.

FARIA, A. F. DE; PERREAULT, F.; SHAULSKY, E.; ARIAS CHAVEZ, LAURA H; *et al.* Antimicrobial Electrospun Biopolymer Nanofiber Mats Functionalized with Graphene Oxide–Silver Nanocomposites. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 23, p. 12751–12759, 17 jun. 2015.

FARIA, A. F. DE; PERREAULT, F.; SHAULSKY, E.; ARIAS CHAVEZ, LAURA H.; *et al.* Antimicrobial Electrospun Biopolymer Nanofiber Mats Functionalized with Graphene Oxide–Silver Nanocomposites. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 23, p. 12751–12759, 17 jun. 2015.

FARIA, A. F. DE *et al.* Cellulose acetate membrane embedded with graphene oxide–silver nanocomposites and its ability to suppress microbial proliferation. **Cellulose**, v. 24, n. 2, p. 781–796, 28 fev. 2017.

- FARIA, A. F.; PERREAULT, F.; ELIMELECH, M. Elucidating the Role of Oxidative Debris in the Antimicrobial Properties of Graphene Oxide. **ACS Applied Nano Materials**, v. 1, n. 3, p. 1164–1174, mar. 2018.
- FIROUZJAEI, M. D.; SHAMSABADI, A. A.; SHARIFIAN GH., M.; *et al.* A Novel Nanocomposite with Superior Antibacterial Activity: A Silver-Based Metal Organic Framework Embellished with Graphene Oxide. **Advanced Materials Interfaces**, v. 5, n. 11, p. 1701365, jun. 2018.
- FIROUZJAEI, M. D.; SHAMSABADI, A. A.; AKTIJ, S. A.; *et al.* Exploiting Synergetic Effects of Graphene Oxide and a Silver-Based Metal–Organic Framework To Enhance Antifouling and Anti-Biofouling Properties of Thin-Film Nanocomposite Membranes. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 49, p. 42967–42978, 12 dez. 2018.
- FISCHER, M. J. E. Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 627, p. 55–73, 2010.
- FLAUZINO NETO, W. P. *et al.* Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue – Soy hulls. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 480–488, mar. 2013.
- FLEMMING, H.-C. *et al.* Biofouling—the Achilles heel of membrane processes. **Desalination**, v. 113, n. 2–3, p. 215–225, nov. 1997.
- GARG, M. C.; JOSHI, H. A Review on PV-RO Process: Solution to Drinking Water Scarcity due to High Salinity in Non-Electrified Rural Areas. **Separation Science and Technology**, v. 50, n. 8, p. 1270–1283, 24 maio 2015.
- GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049–1056, set. 2008.
- GOH, P. S. *et al.* Contemporary antibiofouling modifications of reverse osmosis desalination membrane: A review. **Desalination**, v. 468, p. 114072, out. 2019.
- GRISHKEWICH, N. *et al.* Recent advances in the application of cellulose nanocrystals. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 29, p. 32–45, 2017.
- HAN, W. *et al.* Graphene family nanomaterials (GFNs)—promising materials for antimicrobial coating and film: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 358, p. 1022–1037, fev. 2019.
- HASSAN, G. *et al.* Dehydroabietylamine-Based Cellulose Nanofibril Films: A New Class of Sustainable Biomaterials for Highly Efficient, Broad-Spectrum Antimicrobial Effects. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 5, p. 5002–5009, 4 mar. 2019.
- HAZRIN-CHONG, N. H.; MANEFIELD, M. An alternative SEM drying method using hexamethyldisilazane (HMDS) for microbial cell attachment studies on sub-bituminous coal. **Journal of Microbiological Methods**, v. 90, n. 2, p. 96–99, ago. 2012.
- HE, J.; KUNITAKE, T.; NAKAO, A. Facile In Situ Synthesis of Noble Metal Nanoparticles in Porous Cellulose Fibers. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 23, p. 4401–4406, 1 nov. 2003.
- HELLACK, B. *et al.* Analytical methods to assess the oxidative potential of nanoparticles: A review. **Environmental Science: Nano**, v. 4, n. 10, p. 1920–1934, 2017.
- HERZBERG, M.; ELIMELECH, M. Biofouling of reverse osmosis membranes: Role of biofilm-enhanced osmotic pressure. **Journal of Membrane Science**, v. 295, n. 1–2, p. 11–20,

maio 2007.

HOCHSTRAT, R. *et al.* Options for water scarcity and drought management—the role of desalination. **Desalination and Water Treatment**, v. 18, n. 1–3, p. 96–102, 3 jun. 2010.

HOEK, E. M. V.; KIM, A. S.; ELIMELECH, M. Influence of crossflow membrane filter geometry and shear rate on colloidal fouling in reverse osmosis and nanofiltration separations. **Environmental Engineering Science**, v. 19, n. 6, p. 357–372, jul. 2002.

HOENG, F. *et al.* Charge density modification of carboxylated cellulose nanocrystals for stable silver nanoparticles suspension preparation. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 6, p. 1–14, jun. 2015.

HORI, K.; MATSUMOTO, S. Bacterial adhesion: From mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 424–434, 2010.

HOSPODAROVA, V.; SINGOVSKA, E.; STEVULOVA, N. Characterization of Cellulosic Fibers by FTIR Spectroscopy for Their Further Implementation to Building Materials. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 09, n. 06, p. 303–310, 2018.

HUA, J. *et al.* Preparation and properties of EDC/NHS mediated crosslinking poly (gamma-glutamic acid)/epsilon-polylysine hydrogels. **Materials Science and Engineering: C**, v. 61, p. 879–892, abr. 2016.

IFUKU, S. *et al.* Synthesis of Silver Nanoparticles Templated by TEMPO-Mediated Oxidized Bacterial Cellulose Nanofibers. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 9, p. 2714–2717, 14 set. 2009.

IMLAY, J. A. Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. **Current Opinion in Microbiology**, v. 24, p. 124–131, abr. 2015.

ISLAM, M. S. *et al.* Cellulose nanocrystal (CNC)-inorganic hybrid systems: Synthesis, properties and applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 6, p. 864–883, 2018.

ISOGAI, A.; SAITO, T.; FUKUZUMI, H. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. **Nanoscale**, v. 3, n. 1, p. 71–85, 2011.

JACKSON, J. C. *et al.* Sustainable Cellulose Nanocrystals for Improved Antimicrobial Properties of Thin Film Composite Membranes. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 9, n. 19, p. 6534–6540, maio 2021.

JAKUBEK, Z. J. *et al.* Characterization challenges for a cellulose nanocrystal reference material: dispersion and particle size distributions. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 20, n. 4, p. 98, 5 abr. 2018.

JIANG, S.; LI, Y.; LADEWIG, B. P. A review of reverse osmosis membrane fouling and control strategies. **Science of The Total Environment**, v. 595, p. 567–583, out. 2017.

KANG, G.-D. *et al.* Study on hypochlorite degradation of aromatic polyamide reverse osmosis membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 300, n. 1–2, p. 165–171, ago. 2007.

KANG, S. *et al.* Single-Walled Carbon Nanotubes Exhibit Strong Antimicrobial Activity. **Langmuir**, v. 23, n. 17, p. 8670–8673, ago. 2007.

KANG, S. *et al.* Antibacterial effects of carbon nanotubes: Size does matter! **Langmuir**, v. 24, n. 13, p. 6409–6413, 2008.

KEMPPAINEN, K. *et al.* Spruce bark as an industrial source of condensed tannins and non-

- cellulosic sugars. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 158–168, jan. 2014.
- KHATOON, Z. *et al.* Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. **Heliyon**, v. 4, n. 12, p. e01067, dez. 2018.
- KLEMM, D. *et al.* Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, maio 2005.
- KONATÉ, K. *et al.* Antibacterial activity against β -lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistant Staphylococcus aureus: fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 11, n. 1, p. 18, 2012.
- KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 1–2, p. 9–27, jun. 1998.
- KUMAR, R.; MÜNSTEDT, H. Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. **Biomaterials**, v. 26, n. 14, p. 2081–2088, maio 2005.
- KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 71, 25 dez. 2015.
- LAM, C.-W. Pulmonary Toxicity of Single-Wall Carbon Nanotubes in Mice 7 and 90 Days After Intratracheal Instillation. **Toxicological Sciences**, v. 77, n. 1, p. 126–134, 22 dez. 2003.
- LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 371–384, 13 jun. 2013.
- LI, J. *et al.* Nanocellulose-Based Antibacterial Materials. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 20, p. 1800334, out. 2018.
- LIU, C.; LEE, J.; MA, J.; *et al.* Antifouling Thin-Film Composite Membranes by Controlled Architecture of Zwitterionic Polymer Brush Layer. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 4, p. 2161–2169, 2017.
- LIU, C.; FARIA, A. F.; *et al.* Mitigation of Biofilm Development on Thin-Film Composite Membranes Functionalized with Zwitterionic Polymers and Silver Nanoparticles. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 1, p. 182–191, 3 jan. 2017.
- LIU, C.; LEE, J.; SMALL, C.; *et al.* Comparison of organic fouling resistance of thin-film composite membranes modified by hydrophilic silica nanoparticles and zwitterionic polymer brushes. **Journal of Membrane Science**, v. 544, p. 135–142, dez. 2017.
- LIU, C. *et al.* Enhancing the anti-fouling and fouling removal properties of thin-film composite membranes through an intercalated functionalization method. **Environmental Science: Water Research & Technology**, v. 7, n. 7, p. 1336–1347, 2021.
- LIU, H. *et al.* Preparation of silver nanoparticles on cellulose nanocrystals and the application in electrochemical detection of DNA hybridization. **Cellulose**, v. 18, n. 1, p. 67–74, 2011.
- LIU, J. *et al.* Templated synthesis of a 1D Ag nanohybrid in the solid state and its organized network for strain-sensing applications. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 6, n. 40, p. 10730–10738, out. 2018.
- LIU, K. *et al.* Preparation of the CNC/Ag/beeswax composites for enhancing antibacterial and water resistance properties of paper. **Carbohydrate Polymers**, v. 142, p. 183–188, maio 2016.

- LIU, L.-F. *et al.* Modification of polyamide TFC nanofiltration membrane for improving separation and antifouling properties. **RSC Advances**, v. 8, n. 27, p. 15102–15110, 2018.
- LIU, S. *et al.* Antibacterial Activity of Graphite, Graphite Oxide, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide: Membrane and Oxidative Stress. **ACS Nano**, v. 5, n. 9, p. 6971–6980, set. 2011.
- LIU, S. *et al.* Enhancement of desalination performance of thin-film nanocomposite membrane by cellulose nanofibers. **Journal of Membrane Science**, v. 592, p. 117363, dez. 2019.
- LIU, X. *et al.* Antioxidant Deactivation on Graphenic Nanocarbon Surfaces. **Small**, v. 7, n. 19, p. 2775–2785, out. 2011.
- LU, X. *et al.* Enhanced antibacterial activity through the controlled alignment of graphene oxide nanosheets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 46, p. E9793–E9801, 14 nov. 2017.
- LÜ, Z. *et al.* Separation and anti-dye-deposition properties of polyamide thin-film composite membrane modified via surface tertiary amination followed by zwitterionic functionalization. **Journal of Membrane Science**, v. 604, p. 118063, jun. 2020.
- LV, J. *et al.* One-pot synthesis of CNC-Ag@AgCl with antifouling and antibacterial properties. **Cellulose**, v. 26, n. 13–14, p. 7837–7846, 6 set. 2019.
- MA, Z. *et al.* In-situ synthesis and immobilization of silver nanoparticles on microfibrillated cellulose for long-term antibacterial applications. **Cellulose**, v. 28, n. 10, p. 6287–6303, 19 jul. 2021.
- MAHMOUD, K. A. *et al.* Effect of surface charge on the cellular uptake and cytotoxicity of fluorescent labeled cellulose nanocrystals. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 2, n. 10, p. 2924–2932, 2010.
- MANJU, S.; SAGAR, N. Renewable energy integrated desalination: A sustainable solution to overcome future fresh-water scarcity in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 594–609, jun. 2017.
- MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G. A. *et al.* Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 8, p. 1343–1348, dez. 2008.
- MEBERT, A. M. *et al.* Surface chemistry of nanobiomaterials with antimicrobial activity**In memoriam of Professor Dr. Luis Diaz. *In: Surface Chemistry of Nanobiomaterials*. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 135–162.
- MORAES, A. C. M. DE *et al.* Graphene oxide-silver nanocomposite as a promising biocidal agent against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Nanomedicine**, p. 6847, nov. 2015.
- MOU, K. *et al.* 2,3-Dialdehyde nanofibrillated cellulose as a potential material for the treatment of MRSA infection. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 38, p. 7876–7884, 2017.
- MUÑOZ-BONILLA, A. *et al.* Bio-Based Polymers with Antimicrobial Properties towards Sustainable Development. **Materials**, v. 12, n. 4, p. 641, 20 fev. 2019.
- NASCIMENTO, S. A.; REZENDE, C. A. Combined approaches to obtain cellulose

- nanocrystals, nanofibrils and fermentable sugars from elephant grass. **Carbohydrate Polymers**, v. 180, n. August 2017, p. 38–45, 2018.
- NIMDEO, Y. M.; JOSHI, Y. M.; MURALIDHAR, K. Measurement of Mass Diffusivity Using Interferometry through Sensitivity Analysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 49, p. 19338–19350, nov. 2014.
- NORONHA, V. T. *et al.* Physical Membrane-Stress-Mediated Antimicrobial Properties of Cellulose Nanocrystals. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 9, n. 8, p. 3203–3212, 1 mar. 2021.
- OGUNSONA, E. O. *et al.* Engineered nanomaterials for antimicrobial applications: A review. **Applied Materials Today**, v. 18, p. 100473, mar. 2020.
- ONG, C. S. *et al.* Nanomaterials for biofouling and scaling mitigation of thin film composite membrane: A review. **Desalination**, v. 393, p. 2–15, set. 2016.
- OUAY, B. LE; STELLACCI, F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. **Nano Today**, v. 10, n. 3, p. 339–354, 2015.
- PARK, C. H. *et al.* Cellulose nanocrystal-assembled reverse osmosis membranes with high rejection performance and excellent antifouling. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 7, n. 8, p. 3992–4001, 2019.
- PARK, S. *et al.* Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, p. 10, 2010.
- PASQUINI, L. M. *et al.* Impact of Surface Functionalization on Bacterial Cytotoxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 11, p. 6297–6305, 5 jun. 2012.
- PASQUINI, L. M. *et al.* Realizing Comparable Oxidative and Cytotoxic Potential of Single- and Multiwalled Carbon Nanotubes through Annealing. **Environmental Science & Technology**, p. 130726133045005, jul. 2013.
- PAULA, A. J.; HWANG, G.; KOO, H. Dynamics of bacterial population growth in biofilms resemble spatial and structural aspects of urbanization. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1354, 13 dez. 2020.
- PENG, J. *et al.* Polyamide nanofiltration membrane with high separation performance prepared by EDC/NHS mediated interfacial polymerization. **Journal of Membrane Science**, v. 427, p. 92–100, jan. 2013.
- PERREAULT, F. *et al.* Antimicrobial Properties of Graphene Oxide Nanosheets: Why Size Matters. **ACS Nano**, v. 9, n. 7, p. 7226–7236, 2015.
- PERREAULT, F. F.; TOUSLEY, M. E.; ELIMELECH, M. Thin-Film Composite Polyamide Membranes Functionalized with Biocidal Graphene Oxide Nanosheets. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 1, n. 1, p. 71–76, 14 jan. 2014.
- PERREAULT, F.; FONSECA DE FARIA, A.; ELIMELECH, M. Environmental applications of graphene-based nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 16, p. 5861–5896, ago. 2015.
- PINTO, L. O.; BERNARDES, J. S.; REZENDE, C. A. Low-energy preparation of cellulose nanofibers from sugarcane bagasse by modulating the surface charge density. **Carbohydrate Polymers**, v. 218, p. 145–153, ago. 2019.

- PINTO, R. M. *et al.* Impact of nanosystems in *Staphylococcus aureus* biofilms treatment. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 6, p. 622–641, 2019.
- PROCÓPIO, L. The role of biofilms in the corrosion of steel in marine environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 73, 29 maio 2019.
- QING, Y. *et al.* Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 13, p. 3311–3327, jun. 2018.
- REZENDE, C. A. *et al.* Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 54, 2011.
- RIETH, M. D.; LOZANO, A. Preparation of DPPC liposomes using probe-tip sonication: Investigating intrinsic factors affecting temperature phase transitions. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 22, p. 100764, jul. 2020.
- RILEY, E. P. *et al.* Milestones in *Bacillus subtilis* sporulation research. **Microbial Cell**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 4 jan. 2021.
- ROCHA, G. J. DE M. *et al.* Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 663–670, jan. 2011.
- RODRIGUES, D. F.; JAISI, D. P.; ELIMELECH, M. Toxicity of functionalized single-walled carbon nanotubes on soil microbial communities: Implications for nutrient cycling in soil. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 625–633, 2013.
- ROMIO, K. B. *et al.* Incorporation of triclosan and acridine orange into liposomes for evaluating the susceptibility of *Candida albicans*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 173, n. June, p. 514–521, 2017.
- SANTOS, C. A. DOS *et al.* Silver Nanoparticles: Therapeutical Uses, Toxicity, and Safety Issues. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 7, p. 1931–1944, jul. 2014.
- SEABRA, A. B. *et al.* Cellulose nanocrystals as carriers in medicine and their toxicities: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, n. December 2017, p. 514–527, 2018.
- SHAMAILA, S. *et al.* Gold Nanoparticles: An Efficient Antimicrobial Agent against Enteric Bacterial Human Pathogen. **Nanomaterials**, v. 6, n. 4, p. 71, 14 abr. 2016.
- SHARIFI, S. *et al.* Toxicity of nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 6, p. 2323–2343, 2012.
- SHEN, L. *et al.* Performance enhancement of TFC FO membranes with polyethyleneimine modification and post-treatment. **Journal of Membrane Science**, v. 534, p. 46–58, jul. 2017.
- SHI, Z. *et al.* Enhanced colloidal stability and antibacterial performance of silver nanoparticles/cellulose nanocrystal hybrids. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 4, p. 603–611, 2015.
- SHOJAEIARANI, J.; BAJWA, D. S.; CHANDA, S. Cellulose nanocrystal based composites: A review. **Composites Part C: Open Access**, v. 5, p. 100164, jul. 2021.
- SILVA, M. DA; TESSARO, I.; WADA, K. Investigation of oxidative degradation of polyamide reverse osmosis membranes by monochloramine solutions. **Journal of Membrane Science**, v. 282, n. 1–2, p. 375–382, 5 out. 2006.

- SMITH, E. *et al.* Functionalized Cellulose Nanocrystal Nanocomposite Membranes with Controlled Interfacial Transport for Improved Reverse Osmosis Performance. **Nanomaterials**, v. 9, n. 1, p. 125, 20 jan. 2019.
- SMITHA, S. L. *et al.* Studies on surface plasmon resonance and photoluminescence of silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, n. 1, p. 186–190, nov. 2008.
- SPAGNOL, C. *et al.* Cellulose nanowhiskers decorated with silver nanoparticles as an additive to antibacterial polymers membranes fabricated by electrospinning. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 531, p. 705–715, 2018.
- TANG, C. Y. *et al.* Potable Water Reuse through Advanced Membrane Technology. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 18, p. 10215–10223, 18 set. 2018.
- TANG, C. Y.; KWON, Y.-N.; LECKIE, J. O. Effect of membrane chemistry and coating layer on physiochemical properties of thin film composite polyamide RO and NF membranes. **Desalination**, v. 242, n. 1–3, p. 149–167, jun. 2009.
- TANG, J. *et al.* Functionalization of cellulose nanocrystals for advanced applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 494, p. 397–409, 2017.
- TEJAMAYA, M. *et al.* Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 13, p. 7011–7017, 2012.
- THOMPSON, L. *et al.* Cellulose Nanocrystals: Production, Functionalization and Advanced Applications. **Reviews On Advanced Materials Science**, v. 58, n. 1, p. 1–16, 1 abr. 2019.
- TIRAFERRI, A.; D. VECITIS, C.; ELIMELECH, M. Covalent Binding of Single-Walled Carbon Nanotubes to Polyamide Membranes for Antimicrobial Surface Properties. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 3, n. 8, p. 2869–2877, jun. 2011.
- TRACHE, D. *et al.* Recent progress in cellulose nanocrystals: sources and production. **Nanoscale**, v. 9, n. 5, p. 1763–1786, 2017.
- TYAGI, P. *et al.* High-Strength Antibacterial Chitosan–Cellulose Nanocrystal Composite Tissue Paper. **Langmuir**, v. 35, n. 1, p. 104–112, 8 jan. 2019.
- VECITIS, C. D. *et al.* Electronic-Structure-Dependent Bacterial Cytotoxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes. **ACS Nano**, v. 4, n. 9, p. 5471–5479, 28 set. 2010.
- VOISIN, H. *et al.* Nanocellulose-Based Materials for Water Purification. **Nanomaterials**, v. 7, n. 3, p. 57, 5 mar. 2017.
- WANG, J.-J. *et al.* Nanofiltration membranes with cellulose nanocrystals as an interlayer for unprecedented performance. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 5, n. 31, p. 16289–16295, 2017.
- WANG, S. *et al.* Nanocrystalline Cellulose-Assisted Generation of Silver Nanoparticles for Nonenzymatic Glucose Detection and Antibacterial Agent. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 7, p. 2472–2478, 2016.
- WHITEHEAD, K. A. *et al.* Antimicrobial activity of graphene oxide-metal hybrids. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 123, p. 182–190, set. 2017.
- XIE, S. *et al.* Applications of Cellulose Nanocrystals: A Review. **Engineered Science**, 2018.

XU, C. *et al.* Cellulose nanocrystal/silver (CNC/Ag) thin-film nanocomposite nanofiltration membranes with multifunctional properties. **Environmental Science: Nano**, v. 7, n. 3, p. 803–816, 2020.

XU, X. *et al.* Properties of novel polyvinyl alcohol/cellulose nanocrystals/silver nanoparticles blend membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1573–1577, 2013.

YANG, C. *et al.* Antimicrobial Activity of Single-Walled Carbon Nanotubes: Length Effect. **Langmuir**, v. 26, n. 20, p. 16013–16019, out. 2010.

YANG, W. J. *et al.* Polymer brush coatings for combating marine biofouling. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 5, p. 1017–1042, maio 2014.

YU, S.; YIN, Y.; LIU, J. Silver nanoparticles in the environment. **Environ. Sci.: Processes Impacts**, v. 15, n. 1, p. 78–92, 2013.

ZHAO, X.; LIU, R. Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels. **Environment International**, v. 40, p. 244–255, abr. 2012.

ZHOU, Y. *et al.* Acid-Free Preparation of Cellulose Nanocrystals by TEMPO Oxidation and Subsequent Cavitation. **Biomacromolecules**, v. 19, n. 2, p. 633–639, fev. 2018.

ZHU, J. *et al.* Cellulose nanocrystal assisted trace silver nitrate to synthesize green silver nanocomposites with antibacterial activity. **RSC Advances**, v. 11, n. 7, p. 3808–3815, 2021.

ZIREHPOUR, A. *et al.* Mitigation of Thin-Film Composite Membrane Biofouling via Immobilizing Nano-Sized Biocidal Reservoirs in the Membrane Active Layer. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 10, p. 5511–5522, 16 maio 2017.

ZUCKER, I. *et al.* Loss of Phospholipid Membrane Integrity Induced by Two-Dimensional Nanomaterials. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 4, n. 10, p. 404–409, 10 out. 2017.

ZUCKER, I. *et al.* Shape-Dependent Interactions of Manganese Oxide Nanomaterials with Lipid Bilayer Vesicles. **Langmuir**, v. 35, n. 43, p. 13958–13966, 2019.