



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102018009736-9 A2



(22) Data do Depósito: 14/05/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 26/11/2019

(54) **Título:** FILTROS À BASE DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA MODIFICADA

(51) **Int. Cl.:** B01D 71/10.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; CENTRO DE TECNOLOGIAS ESTRATÉGICAS DO NORDESTE.

(72) **Inventor(es):** MONICA FREIRE BELIAN; WAGNER EDUARDO DA SILVA; ALINE DE ANDRADE ALVES; ANDRE GALEMBECK; LUDHIMILLA SUELEN GOMES LINS DE LIMA.

(57) **Resumo:** ?FILTROS À BASE DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA MODIFICADA?. A presente invenção trata-se de duas composições de filtros à base de celulose bacteriana, cujas modificações consistem em: (i) celulose bacteriana contendo em sua composição sílica; e (ii) celulose bacteriana possuindo sílica e um reagente que se funcionaliza (liga-se) na fibra de celulose agindo como ligante ponte; apresentando estas membranas modificadas, promissora capacidade filtrante de bactérias, fungos e metais, constituindo assim, em potencial componente (agente) filtrante a ser aplicado em filtros (artefatos) para hemodiálise, purificação de águas e efluentes, e cromatografia. As referidas membranas modificadas apresentam alta capacidade filtrante, podendo ser reutilizadas, mesmo após 10 filtrações, sem perderem sua capacidade filtrante. A presente invenção apresenta-se como inovação tecnológica, pois possui modificações estruturais na membrana de celulose bacteriana e potencial aplicação como filtro. Avaliando-se a capacidade filtrante das membranas modificadas, após 10 filtrações consecutivas de certo volume de meio contendo biomassa bacteriana, o filtrado foi analisado por espectroscopia de absorção eletrônica e contagem direta das células por microscopia óptica com auxílio da câmara de Neubauer. Dessa forma, não foi observada saturação das membranas (entupimento) por parte dessa biomassa bacteriana mesmo após as 10 filtrações consecutivas, ou seja, a presente invenção impediu (...).



“FILTROS À BASE DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA
MODIFICADA”

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo de Invenção

[001] A presente invenção trata-se de duas composições de filtros à base de celulose bacteriana, cujas modificações consistem em: (i) celulose bacteriana contendo em sua composição sílica; e (ii) celulose bacteriana possuindo sílica e um reagente que se funcionaliza (liga-se) na fibra de celulose agindo como ligante ponte entre as fibras; apresentando estas membranas modificadas, promissoras capacidades filtrantes de bactérias e metais, constituindo assim, em potenciais componentes (agentes) filtrantes a serem aplicados em filtros (artefatos) para hemodiálise, cromatografia, purificação de águas e efluentes. As referidas membranas modificadas (presente invenção) apresentam alta capacidade filtrante, podendo ser reutilizada, sem perder sua capacidade filtrante. A referida invenção apresenta-se como inovação tecnológica, pois apresenta modificações estruturais na membrana de celulose bacteriana e potencial aplicação como filtro. A presente invenção (filtro) apresentou-se eficiente quando comparada aos filtros de celulose disponíveis no mercado.

Sumário

[002] A presente invenção consiste em duas composições de membranas de celulose bacteriana (CB) modificadas; cuja capacidade filtrante de ambos os sistemas foi avaliada utilizando-se, preferencialmente, bactérias como modelo microbiológico a ser retido. Após cada filtração realizada com as membranas modificadas, a possível presença da biomassa no filtrado, ou seja, a biomassa remanescente foi analisada por: (i) espectroscopia de absorção eletrônica (método turbidimétrico utilizando escala de *Mcfarland*) e por (ii) contagem direta das células por microscopia óptica com auxílio da câmara de *Neubauer*. As membranas de celulose bacteriana modificadas não

apresentaram saturação (entupimento) por parte da biomassa utilizada como modelo microbiológico preferencial (bactérias), mesmo após 10 filtrações consecutivas de meio; bem como, impediram a passagem da biomassa junto ao meio líquido (filtrado), o que se confirmou pelos valores, tanto de absorvância quanto de contagem de células, iguais a zero para ambos os métodos: (i) utilizando-se escala de *Mcfarland* (absorvâncias) e (ii) utilizando-se câmara de *Neubauer*.

Anterioridades

[003] A primeira observação científica reportada acerca da produção de celulose por *Gluconacetobacter xylinus* se deu em 1886, para a qual se constatou o crescimento de uma película branca e gelatinosa (celulose) na superfície do meio de cultura durante a produção de vinagre. A bactéria isolada foi denominada como *Acetobacter xylinum* atualmente reclassificada como *Gluconacetobacter xylinus*. Além da *Gluconacetobacter xylinus* vários gêneros de microrganismos são capazes de excretar a celulose tais como: *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azobacter*, *Salmonella*, *Escherichia* e *Sarcina* incluindo diversos fungos (*Sulaeva, I., Henniges, U., Rosenau, T., Potthast, A., Biotechnology Advances, 33, 8 (2015) 1547–1571*) e (*Sheykhnazari, S., Tabarsa, T., Ashori, A., Shakeri, A., Golalipour, M., Carbohydrate Polymers, 86 (2011) 1187-1191*).

[004] A película de celulose formada funciona como uma proteção contra a radiação ultravioleta letal para a maioria dos microrganismos, inclusive o que a produz; a mesma também permite a retenção de umidade e fixa as bactérias na interface ar-líquido possibilitando a obtenção de oxigênio essencial para o seu crescimento (*Setyawaiti, M. I., Chien, L. J., Lee, C. K., Biochemical Engineering Journal, 43 (2009) 78-84*). A *Gluconacetobacter xylinum* é uma bactéria não patogênica, gram negativa, aeróbica estrita que produz celulose quando incubada em aproximadamente 30 °C e pH 3 - 7. É encontrada principalmente em frutas e sucos em decomposição, e tem ganhado uma atenção especial devido a sua maior capacidade de produzir celulose, justificando a sua utilização em grande escala (*Bilgi, E., Bayir, E., Sedenmir-*

Urkmez E., Hames E. E., *International Journal of Biological Macromolecules*, 90 (2016) 2-9). Esse microrganismo pode ser incubado para produzir celulose tanto em condições estática quanto dinâmica (sob agitação). Em cultivo estático há formação de uma película uniforme (na interface líquido-atmosfera) que pode ser utilizada na produção de curativos pela possibilidade de se adequar perfeitamente as irregularidades na pele causadas pelos ferimentos. A produção dinâmica produz *pellets* de celulose com tamanhos e formas variadas e é amplamente utilizado na indústria alimentícia (Shi, Z., Phillips, G. O., Yang, G., *Food Hydrocolloids*, 35 (2013) 1-7).

[005] Com o intuito de explorar todas as propriedades da celulose bacteriana e de expandir seu potencial de aplicação, dois processos de modificação são, comumente, realizados: a modificação *in situ* e a modificação *ex situ*. As reações químicas para a inclusão da modificação acontecem, preferencialmente, com os grupos hidroxilas da celulose, originando ao final de todas as etapas sintéticas utilizadas, materiais de grande importância tecnológica (Hu, W., Chen, S., Yang, J., Zhe, L., Huaping, W, *Carbohydrate Polymers*, 101 (2014) 1043-1060).

[006] Diversos trabalhos, descritos na literatura, reportam a modificação da CB *ex situ*, como a produção de material híbrido orgânico-inorgânico composto por celulose bacteriana e nanopartículas de sílica (Barud, H. S., Assunção, R. M. N., Martines, M. A. U., Dexpert-Ghys, J., Marques, R. F. C., Messaddeq, Y., Ribeiro, S. J. L., *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 46 (2008) 363-367). Alguns trabalhos descritos na literatura, de uma forma geral, apresentam estratégias sintéticas na produção de nanopartículas monodispersas de sílica entre as nanofibrilas da membrana celulósica, e com isso aumentar a estabilidade térmica da celulose, porém há comprometimento nas propriedades mecânicas da membrana de CB.

[007] Em outros relatos presentes na literatura, os autores impregnaram membranas de celulose bacteriana com nanopartículas de prata demonstrando que o material apresentou boa atividade antimicrobiana tanto para bactérias gram negativas (*E. coli*) quanto para as gram positivas (*S. aureus*). O fator

limitante para impregnação de nanopartículas de prata em celulose bacteriana é a fraca interação, meramente eletrostática, entre a prata e a CB podendo ocasionar uma liberação descontrolada do metal (*Hu, W., Chen, S., Yang, J., Li, Y. Z., Wang, H., Carbohydrate Polymers, 101 (2014) 1043-1060*).

[008] O processo de separação por membranas sintéticas, a nível industrial, começou a consolidar-se a partir da década de 60 com o surgimento de novas técnicas de separação como a microfiltração, ultrafiltração e osmose reversa. O primeiro relato da utilização de membranas na separação de componentes foi a partir da utilização de um diafragma animal para observação da permeação de uma mistura homogênea. A observação de um fluxo preferencial foi relatada, e, pela primeira vez, características de seletividade e permeabilidade de uma membrana foram observadas (*Habert, A. C., Processo de Separação por Membranas, Rio de Janeiro, Brasil, 2006, Editora E-papers. 181 p*).

[009] Em 1953, membranas de acetato de celulose foram reportadas, pela primeira vez, como um material de grande eficiência para a retenção salina em sistemas de osmose reversa, despertando cada vez mais o interesse entre os pesquisadores para o desenvolvimento de novos materiais com maior capacidade filtrante e baixo custo. A limitação da utilização dessas membranas é a susceptibilidade de ataques ácidos e básicos aos grupos acetil e a possibilidade de contaminação biológica.

[010] Ésteres de celulose são considerados polímeros semi-sintéticos, por conta da presença da celulose, que é um polímero natural. O acetato de celulose e o nitrato de celulose foram os primeiros materiais derivados da celulose produzidos em laboratório como agentes filtrantes (*Edgar, K. J., Buchanan, C. M., Debenham, J. S., Rundquist, P. A., Seiler, B. D., Shelton, M. C., Tindall, D., Progress in Polymer Science, 29 (2001) 1605-1688*). A utilização de acetato de celulose na produção de membranas para filtração confere ao material elevada resistência mecânica, biodegradabilidade, alta capacidade de filtração, alta porosidade além de ser um material de baixo custo, levando em consideração que a celulose vegetal é o polímero de maior abundância da

terra. Essas membranas são produzidas a partir da acetilação das hidroxilas presentes na molécula de glicose em diversos graus de substituição. Acetato de celulose, na sua forma trissubstituída, é utilizada para a produção de diversos tipos de membranas para microfiltração, ultrafiltração e osmose reversa (Fan, G., Wang, M., Liao, C., Fang, T., Li, J., Zhou, R., *Carbohydrates Polymers*, 94 (2013) 71-76). Após a acetilação da celulose bacteriana, há uma diminuição na cristalinidade do material por conta da diminuição da quantidade de hidroxilas diminuindo a possibilidade de formação da ligação de hidrogênio intramolecular e intermolecular. Atualmente, uma série de polímeros como poliamidas, poliolefinas, blendas de acetato de celulose e nitrocelulose são utilizados na fabricação de membranas para microfiltração.

[011] A hidrofiliçidade da celulose, alta porosidade, alta estabilidade térmica e mecânica, e a possibilidade de inserção de reagentes químicos à membrana têm motivado a utilização desses materiais como agentes filtrantes. Nesse sentido, a membrana de celulose bacteriana modificada com proteína de soja isolada para a filtração de partículas do ar. Os autores relataram que a membrana removeu 99% das partículas do ar de diversos tamanhos e acreditam que a eficiência do filtro produzido está atrelada a captação física das partículas pelas redes tridimensionais formadas pelas nanofibrilas e atrações eletrostáticas entre as partículas e a proteína isolada de soja utilizada para modificar a celulose.

[012] Não foram encontradas patentes que utilizem celulose bacteriana ou biocelulose atuando como suporte químico modificado para processos de filtração. Os filtros que utilizam celulose como matéria-prima são de fontes vegetais e por isso não serão citados, por não apresentarem correlação com a presente invenção.

Problemas e Limitações do Estado da Técnica

[013] Os filtros de celulose comerciais apresentam baixa capacidade filtrante e facilidade de entupimento (saturação por parte da biomassa) desde a primeira tentativa de filtrar 3×10^8 células/mL de *E. Coli* em 10 mL de meio de cultura (modelo preferencialmente utilizado). Para todas as repetições

(triplicatas e marcas diferentes), o filtrado analisado segundo (i) espectroscopia de absorção eletrônica (método turbidimétrico utilizando escala de *Mcfarland*, monitorando em 660 nm) apresentaram altos valores de absorbância ($A_o = 0,668$ e $A_f = 0,425$) e (ii) contagem direta das células por microscopia óptica com auxílio da câmara de *Neubauer* (valores de contagem celular de entrada igual a 3×10^8 células/mL; e de saída igual a $1,8 \times 10^7$ células/mL), o que sinaliza através de ambas as metodologias uma baixa eficácia filtrante por parte do material padrão comercial testado.

[014] O objetivo da presente invenção é apresentar duas composições de materiais filtrantes à base de celulose bacteriana modificada, capaz de filtrar de forma eficiente um modelo microbiológico, para o qual se utilizou preferencialmente uma linhagem de bactéria; podendo ser, a presente invenção, promissor componente de artefato filtrante para metais e matéria orgânica, assim como, atuar como fase estacionária para cromatografia.

Solução

[015] A presente invenção consiste em duas composições à base de membrana de celulose bacteriana modificada, cujas constituições podem conter, de forma geral: sílica, sililantes e um reagente o qual possibilita a formação de ligações em ponte entre as fibrilas da celulose; resultando em um material capaz de filtrar de forma eficiente microrganismos, metais e matéria orgânica; e atuar como fase estacionária em cromatografia. Após testes de filtração com volume fixo de meio (10 mL) contendo microrganismo, as membranas modificadas apresentaram capacidade filtrante para as quais se avaliaram vazão, bem como retenção de biomassa, ou seja, o conteúdo celular no meio líquido remanescente (10 mL) segundo metodologias que se valerem tanto de absorbância (utilizando-se escala de *Mcfarland*), quanto de contagem direta de células (utilizando-se câmara de *Neubauer*), para as quais se obtiveram valores de suas grandezas correspondentes iguais a zero para ambos os métodos.

Vantagens

[016] Os filtros de celulose comerciais apresentaram resultados inferiores quando comparadas a CB demonstrando saturação desde a primeira filtração. Segundo análise do filtrado analisado por (i) espectroscopia de absorção eletrônica (monitorando em 660 nm) os valores de absorbância apresentaram-se altos ($A_o = 0,668$ e $A_f = 0,425$); bem como, (ii) a contagem direta de microrganismos, utilizando-se a microscopia óptica, mostraram valores de entrada (antes da filtração), iguais a 3×10^8 células/mL, em 10 mL de meio, e de saída (após filtração) iguais a $1,8 \times 10^7$ células/mL; o que confirma uma baixa eficácia por parte dos filtros comerciais utilizados, preferencialmente, para este problema-modelo proposto.

[017] A análise dos resultados mostra que essas membranas comerciais não têm capacidade (eficiência) para filtrar altas concentrações de microrganismos diferentemente do que foi observado para a presente invenção, ou seja, a membrana de celulose bacteriana modificada. Outra vantagem encontrada foi o alto tempo de filtração (no que se reflete em maior vazão) para um volume fixo de 10 mL de meio contendo 3×10^8 células/mL de *E. coli*, da ordem de segundos a poucos minutos (≤ 4 minutos), diferindo da membrana comercial a qual leva, no mínimo, 15 minutos para filtrar, de forma ineficiente (conforme alta contagem de célula remanescente) esse volume (10 mL) de meio líquido, como descrito anteriormente.

[018] As membranas de celulose bacteriana modificadas não apresentaram saturação mesmo após 10 filtrações consecutivas de inóculo, ou seja, as membranas mantiveram sua capacidade filtrante até a décima filtração. Além disso, o filtrado analisado era límpido e translúcido apresentando 0 (zero) de absorbância para todas as análises e 0 (zero) células de *E.coli* por mL de acordo com a contagem na câmara de *Neubauer*.

Descrição Detalhada

[019] As membranas de celulose bacteriana (CB) foram produzidas, preferencialmente, utilizando o meio de cultura do tipo Hestrin-Schramm (*Hestrin, S., Schramm. M., Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum, II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose,*

Biochemistry Journal, 58 (1954) 345-352) contendo glicerol como fonte de carbono. A composição final utilizada para o meio de cultivo foi glicerol, compreendendo uma faixa de 25 - 32 g L⁻¹, sendo preferencialmente utilizados 30 g L⁻¹; extrato de levedura, compreendendo uma faixa de 10 - 20 g L⁻¹, sendo preferencialmente utilizados 16 g L⁻¹; fosfato de sódio, compreendendo uma faixa de 2 - 8 g L⁻¹, sendo preferencialmente utilizados 4 g L⁻¹; e ácido succínico, compreendendo uma faixa de 1,5 - 5 g L⁻¹, sendo preferencialmente utilizados 3,5 g L⁻¹. Após a preparação do meio de cultura, o mesmo foi distribuído em tubos de ensaio e em frascos de borosilicato de 250 mL para autoclavação a 121°C durante 20 minutos. O microrganismo utilizado, produtor de membrana celulósica bacteriana, foi o *Gluconacetobacter xylinus* (ATCC 23769).

[020] Para a produção das membranas de celulose bacteriana foi necessária a ativação do microrganismo, e para isso foram distribuídos em tubos de ensaio 90% do meio de cultura e 10% do inóculo. Os tubos de ensaio foram incubados a 35 °C durante 24 horas. Após o tempo requerido 10% do inóculo produzido anteriormente foi novamente adicionado a 90% do meio de cultura estéril e a suspensão foi incubada sob as mesmas condições. Por fim, mantendo sempre a proporção de 10% em volume de inóculo, foram produzidas as membranas em frascos de borosilicato de 250 mL. Após a inoculação, os frascos foram incubados a 30 °C e membranas com um intervalo de dois a quinze dias foram produzidas, preferencialmente utilizadas as de três e cinco dias de cultivo. A purificação e lavagem das membranas foram realizadas em banho-maria, com temperaturas entre 60 - 90°C, sendo preferencialmente utilizado 80°C, com solução de NaOH em concentrações de 0,1 a 0,001 mol L⁻¹, sendo preferencialmente utilizada a 0,01 mol L⁻¹, até a retirada das células e componentes do meio de cultura. O pH foi então ajustado para 7,00 após sucessivas lavagens com água destilada. A CB foi então liofilizada e caracterizada espectroscopicamente.

[021] As modificações da membrana de celulose foram feitas através de soluções etanólicas, numa faixa de concentração de 0,001 – 1 mol L⁻¹, sendo

preferencialmente utilizado $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, dos agentes sililantes. Em um erlenmeyer foi adicionado etanol e a quantidade requerida do sililante. Os reagentes ficaram sob agitação orbital, com rotação entre 100 – 200 rpm, preferencialmente a 170 rpm. Em seguida, a membrana de CB foi mergulhada na solução do sililante e a agitação permaneceu por no mínimo 1 hora. Após o tempo reacional foi adicionado 100 mL de uma solução de NaOH, compreendendo uma faixa de 0,001 a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, sendo preferencialmente utilizado $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Após a adição da base a reação prosseguiu em agitação. As membranas modificadas foram lavadas com solução etanólica, em uma faixa de 10 a 80%, sendo preferencialmente utilizados 50 %; sob agitação orbital, fazendo a troca do sobrenadante a cada 40 minutos durante 3 horas. Após esse tempo, as membranas modificadas foram submetidas à lavagem no ultrassom por 5 tempos de 10 minutos.

[022] Para a segunda modificação da membrana de celulose, as CBs foram mergulhadas em 100 mL de uma solução de NaOH, $0,001 - 1 \text{ mol L}^{-1}$, sendo preferencialmente utilizado $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, durante no mínimo 30 minutos. Em seguida, a membrana de CB foi mergulhada em 20 mL de uma solução de NaOH ($0,001 - 1 \text{ mol L}^{-1}$) contendo de 10-1000 mg de bórax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), sendo preferencialmente usados 100 mg. Após no mínimo 5 horas sob repouso, a membrana de CB foi removida da solução e o excesso de solução básica foi retirado com papel absorvente. Após o tempo requerido, a membrana de CB foi mergulhada em álcool etílico absoluto e 1 a 10 mL de tetraetilortosilicato, sendo preferencialmente utilizados 2 mL; durante no mínimo 24 horas sem agitação. Por fim, a membrana modificada foi lavada com água destilada e solução etanólica, em uma faixa de 10 a 80%, sendo preferencialmente utilizados 50 %.

Exemplo 1: Caracterização das membranas de celulose bacteriana

[023] Os dados gerais, bem como da caracterização espectroscópica (FT-IR, Raios-X e índice de cristalinidade), obtidos para a membrana de celulose bacteriana encontram-se descritos abaixo:

[024] IR cm^{-1} (KBr): ν 3450, 2890, 1643, 1423, 1155, 1032; Raios-X (índice de Miller(hkl) – Intensidade (u.a.) – 2θ): (200) –22,8; (110) –16,8; (1-10) – 14,6. Índice de cristalinidade: 85%.

[025] Os dados gerais, bem como da caracterização espectroscópica (FT-IR, Raios-X, análise termogravimétrica e índice de cristalinidade), obtidos para as membranas de celulose bacterianas modificadas encontram-se descritos abaixo:

[026] IR cm^{-1} (KBr): ν 3450, 3420, 1643, 1423, 1155, 1032 (CB com sililantes); ν 3450, 1643, 1423, 1155, 1032 (CB com bórax); Raios-X (índice de Miller(hkl) – Intensidade (u.a.) – 2θ): (200) –22,8; (110) –16,8; (1-10) – 14,6. Índice de cristalinidade: 82% (CB com sililante); (índice de Miller(hkl) – Intensidade (u.a.) – 2θ): (200) –22,8; (110) –16,8; (1-10) – 14,6. Índice de cristalinidade: 73% (CB com bórax); Dados TG (T_{onset} ; % perda de massa): CB (321 °C; 75%), modificação com sililante (330,7 °C; 71%), e modificação com bórax (318,6 °C; 63%).

Exemplo 2: Testes de capacidade filtrante das membranas de CB modificadas com microrganismo

[027] Após as modificações, as membranas foram testadas quanto a sua capacidade filtrante frente a cepas de *Escherichia coli*. As filtrações foram realizadas tanto com as membranas modificadas quanto com as comerciais, a fim de fazer um comparativo acerca da capacidade filtrante das membranas produzidas. Cada membrana teve um conjunto de 10 filtrações simultâneas com o intuito de observar a capacidade filtrante do material (saturação da mesma com a biomassa utilizada como modelo biológico).

[028] As membranas modificadas foram secas, superficialmente, com papel absorvente e acopladas em um sistema de filtração. Em seguida 10 mL da suspensão de *E. Coli* foi filtrada com o auxílio de uma bomba de vácuo. O filtrado foi submetido à (a) leitura no espectrofotômetro de absorção eletrônica (faixa espectral UV/VIS), modelo Thermo Biomatea, a leitura foi realizada em

660 nm, utilizando-se água destilada estéril como branco, a escala das absorbâncias para as amostras foram comparadas com a escala de *Mcfarland*; já (b) a análise de contagem direta de células, com auxílio de microscópio óptico modelo Leica CME, foi realizada com auxílio de câmara de *Neubauer*. Esses procedimentos, (a) e (b) anteriormente citados, foram repetidos 10 vezes para cada membrana.

[029] As membranas modificadas foram utilizadas para filtração de *E. coli* (bactéria com tamanho médio de 1,1 a 1,5 μm por 2 a 6 μm) mostrando excelente capacidade filtrante frente as membranas comerciais. Após cada filtração, o filtrado foi analisado por espectroscopia de absorção eletrônica e contagem direta das células por microscopia óptica com auxílio da câmara de *Neubauer*. O intuito das análises foi quantificar a concentração de microrganismo remanescente no meio líquido (filtrado).

[030] Membranas comerciais de 0,22 μm foram utilizadas para filtrar a mesma quantidade de microrganismos a fim de comparar os resultados, já que elas são utilizadas para essa finalidade e já estão disponíveis no mercado.

[031] As membranas comerciais apresentaram resultados inferiores quando comparadas a CB modificada demonstrando saturação por parte da biomassa desde a primeira filtração. O filtrado analisado por espectroscopia de absorção eletrônica (monitorando em 660 nm) e microscopia óptica apresentou altas absorbâncias ($A_o = 0,668$ e $A_f = 0,425$) e contagem de microrganismos (entrada de 3×10^8 células/mL; e saída $1,8 \times 10^7$ células/mL). A análise dos resultados mostra que essas membranas comerciais não têm capacidade para filtrar altas concentrações de microrganismos diferentemente do que foi observado para a celulose bacteriana modificada (a presente invenção). A principal vantagem encontrada foi a alta velocidade de filtração, na ordem de segundo a poucos minutos.

[032] A Figura 1 mostra a membrana de celulose modificada após as 10 filtrações consecutivas descritas anteriormente. Sobre a membrana modificada observou-se uma deposição de células de *E. Coli* sobre toda a superfície da membrana que pode ser observada pela coloração amarela.

[033] Legenda da Figura 1:

[034] Figura 1. Membrana de celulose modificada após 10 (dez) filtrações consecutivas de células de *E. Coli*.

[035] As membranas de celulose bacteriana modificadas não apresentaram saturação mesmo após 10 filtrações consecutivas de inóculo, ou seja, as membranas continuaram com excelente capacidade filtrante até a décima filtração, sendo este o limite operacional fixado. Além disso, o filtrado analisado era límpido e translúcido apresentando zero de absorbância para todas as análises e com zero célula de *E.coli* por mL de acordo com a contagem na câmara de *Neubauer*.

REIVINDICAÇÕES

1. “FILTROS À BASE DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA MODIFICADA” **caracterizado por** se tratar de filtros a base de celulose bacteriana, sílica, sililantes (R-NH-R’ e R-SH; onde R = $-(CH_2)_nSi(OC_nH_m)_3$, e R’ = -H, $-CH_2CH_2NH_2$ e $-CH_2CH_2NHCH_2CH_2NH_2$), e um reagente que se funcionaliza (liga-se) na fibra de celulose agindo como ponte o $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ (tetraborato de sódio), apresentando estas membranas modificadas capacidade filtrante contra bactérias, fungos e metais.
2. “FILTROS À BASE DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA MODIFICADA” conforme reivindicação 1, **caracterizado por** apresentar um reagente tipo ponte (tetraborato de sódio), que se ligue covalentemente a celulose e a sílica e sililantes, fazendo com que o material final apresente maior homogeneidade.
3. “FILTROS À BASE DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA MODIFICADA” conforme reivindicações 1 e 2, **caracterizado pelos** sililantes utilizados apresentarem grupo doadores de elétrons (N, O e S), atuando assim, como agentes quelantes de metais.
4. “FILTROS À BASE DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA MODIFICADA” conforme reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizado por** apresentar filtros a base de celulose modificada com capacidade filtrante.
5. ““FILTROS À BASE DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA MODIFICADA” conforme reivindicações 2 e 4, **caracterizado por** apresentar em sua estrutura grupos siloxanos e silanóis ligados na

superfície da celulose, de forma homogênea, através do uso do tetraborato de sódio.

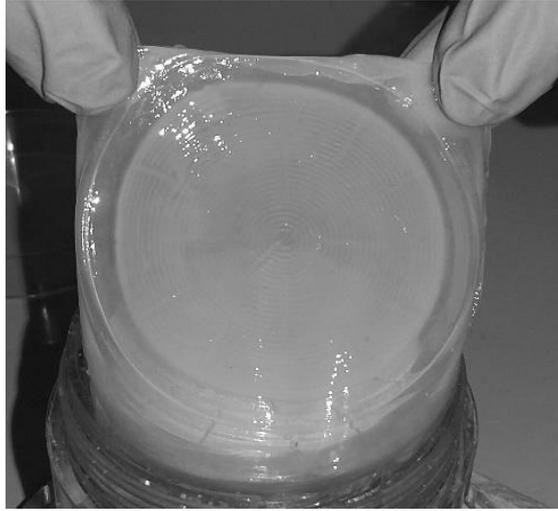


Figura 1.

RESUMO

“FILTROS À BASE DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA MODIFICADA”. A presente invenção trata-se de duas composições de filtros à base de celulose bacteriana, cujas modificações consistem em: (i) celulose bacteriana contendo em sua composição sílica; e (ii) celulose bacteriana possuindo sílica e um reagente que se funcionaliza (liga-se) na fibra de celulose agindo como ligante ponte; apresentando estas membranas modificadas, promissora capacidade filtrante de bactérias, fungos e metais, constituindo assim, em potencial componente (agente) filtrante a ser aplicado em filtros (artefatos) para hemodiálise, purificação de águas e efluentes, e cromatografia. As referidas membranas modificadas apresentam alta capacidade filtrante, podendo ser reutilizadas, mesmo após 10 filtrações, sem perderem sua capacidade filtrante. A presente invenção apresenta-se como inovação tecnológica, pois possui modificações estruturais na membrana de celulose bacteriana e potencial aplicação como filtro. Avaliando-se a capacidade filtrante das membranas modificadas, após 10 filtrações consecutivas de certo volume de meio contendo biomassa bacteriana, o filtrado foi analisado por espectroscopia de absorção eletrônica e contagem direta das células por microscopia óptica com auxílio da câmara de *Neubauer*. Dessa forma, não foi observada saturação das membranas (entupimento) por parte dessa biomassa bacteriana mesmo após as 10 filtrações consecutivas, ou seja, a presente invenção impediu a passagem da biomassa junto ao meio líquido (filtrado), o que se confirmou pelos valores de contagem de células iguais a zero para ambos os métodos: (i) utilizando-se câmara de *Neubauer* e (ii) utilizando-se escala de *Mcfarland* (absorbâncias).