

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

**EFEITO DO MEIO DE CULTIVO E DO TRATAMENTO DE PURIFICAÇÃO NAS
PROPRIEDADES TÉRMICAS E QUÍMICAS DA CELULOSE BACTERIANA**

BIASSANDER CAMILA TURECK

Joinville – SC

2017

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

**EFEITO DO MEIO DE CULTIVO E DO TRATAMENTO DE PURIFICAÇÃO NAS
PROPRIEDADES TÉRMICAS E QUÍMICAS DA CELULOSE BACTERIANA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, na Universidade da Região de Joinville.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa L. S. Schneider.

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula Testa Pezzin.

Joinville – SC

2017

Catalogação na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

T934e Tureck, Biassander Camila
Efeito do meio de cultivo e do tratamento de purificação nas propriedades térmicas e químicas da celulose bacteriana /Biassander Camila Tureck; orientadora Dra. Andréa L. S. Schneider; coorientadora Dra. Ana Paula Testa Pezzin . – Joinville: UNIVILLE, 2017.

72 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos – Universidade da Região de Joinville)

1. Bacteriologia – Cultura e meios de cultura. 2. Celulose. 3. Microbiologia - Pesquisa. I. Schneider, Andréa L. S. (orient.) II. Pezzin, Ana Paula Testa (coorient.). II. Título.

CDD 579.3

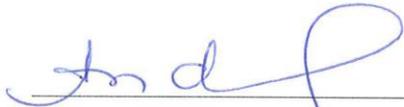
Termo de Aprovação

“Efeito do Meio de Cultivo e do Tratamento de Purificação nas Propriedades Térmicas e Químicas de Celulose Bacteriana”

por

Biassander Camila Tureck

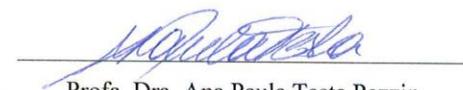
Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, área de concentração Engenharia de Processos e Tecnologias Limpas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Engenharia de Processos.



Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Orientadora (UNIVILLE)

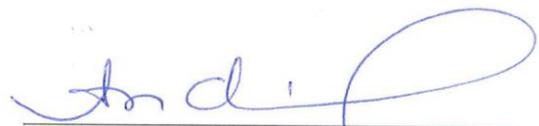


Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Coorientadora (UNIVILLE)

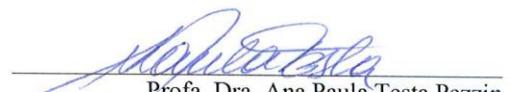


Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Coordenadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

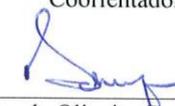
Banca Examinadora:



Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Coorientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Derce de Oliveira Souza Recouvreux
(UFSC)



Prof. Dra. Giannini Pasiznick Apati
(UNIVILLE)

Joinville, 29 de agosto de 2017.

“Quem se arrisca a andar por ares nunca antes respirados ou pensar fora da curva tem grandes chances de encontrar pedras no caminho. No entanto, ninguém é digno de contribuir para a ciência se não usar suas dores e insônia nesse processo. Não há céu sem tempestade. Risos e lágrimas, sucesso e fracasso, aplausos e vaias fazem parte do currículo de cada ser humano, em especial daqueles que são apaixonados por produzir novas ideias. ”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me conceder coragem e determinação, pelas oportunidades que me proporciona e por me proteger constantemente.

Aos meus familiares e pessoas queridas do meu convívio, em especial minha mãe, Santana Fagundes, por sempre me incentivar.

Ao meu esposo Guilherme Giuseppe Bassani, por estar sempre presente, e me apoiar em todos os momentos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Andréa L. S. Schneider, e à minha coorientadora, Profa. Dra. Ana Paula T. Pezzin pela orientação, confiança, incentivo e compreensão, dedicados a mim durante o período de mestrado.

As alunas de Iniciação Científica Haira Gabriela Hackbarth e Wandressa Nathalie Bagon Giacomassi pelo auxílio nas atividades experimentais.

Agradeço também à Univille que me proporcionou bolsa de estudo, aos professores do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos, pelos conhecimentos transmitido, e aos meus colegas de curso, pelo conhecimento compartilhado.

Aos membros da banca examinadora, agradeço por aceitarem avaliar este trabalho, certamente acrescentando valiosas contribuições.

RESUMO

No presente trabalho avaliou-se a obtenção e caracterização de membranas de celulose bacteriana (CB) obtidas por cultivo de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 utilizando manitol, glicose, frutose, lactose, glicerol, inulina e sacarose como fontes alternativas de carbono, e milhocina e Prodex Lac® como fontes de nitrogênio. A formação de membrana gelatinosa de CB foi acompanhada no decorrer de 12 dias, sob condição estática e temperatura de 30 °C, com retirada da membrana formada a cada dois dias para determinação da massa. As membranas foram purificadas por dois métodos diferentes, constatando que o mesmo exerce influência nas propriedades térmicas e químicas do material obtido. Após purificação as membranas foram secas e caracterizadas por análise termogravimétrica (TGA), Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). As maiores concentrações de CB foram encontradas no meio de cultura contendo como fonte de nitrogênio o Prodex Lac®. Dentre os açúcares, frutose e manitol apresentaram os melhores resultados. As análises de TGA indicam que todas as membranas possuem comportamento térmico similar, os resultados de FTIR mostram que quimicamente as diferentes amostras são equivalentes com as estruturas citadas em literatura. As micrografias comprovaram que o meio pode influenciar na morfologia da CB, mas de forma geral, todas apresentaram nanofibras, característica importante na membrana.

Palavras-chave: Celulose bacteriana, *Gluconacetobacter Hansenii*, Prodex Lac®.

ABSTRACT

In the present work, we evaluated the production and characterization of bacterial cellulose (BC) films obtained by cultivating *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 using mannitol, glucose, fructose, lactose, glycerol, inulin and sucrose as alternative carbon sources, corn steep liquor (CSL) and Prodex Lac® as nitrogen sources. The gelatinous membrane formation of CB was monitored for 12 days, under static condition and temperature of 30 °C, with removal of the membrane formed every 2 days for weight selection. As membranes were purified by different methods, showing the same influence on the thermal and chemical properties of the obtained material. After purification as membranes were dried and characterized by scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetric analysis (TG) and Fourier transfer infrared (FTIR). The highest concentrations of BC were found in culture medium containing Prodex Lac® as the nitrogen source. Among the sugars, fructose and mannitol presented the best results. As TG analyzes indicate that all membranes have similar thermal behavior, FTIR results show that chemically as different samples are equivalent with as structures cited in the literature. The micrographs have shown that the medium may influence the morphology of CB, but in general, all presented nanofibers, an important feature in the membrane.

Key words: Bacterial cellulose, *Gluconacetobacter Hansenii*, Prodex Lac®.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática celulose cristalina	23
Figura 2 - Classificação da celulose quanto sua cristalização	24
Figura 3 – Representação dos componentes presentes na celulose vegetal	24
Figura 4 - Via de biossíntese de celulose	27
Figura 5 - Fluxograma de obtenção de CB	39
Figura 6 - Produção de CB	44
Figura 7 - Formação de CB para diferentes fontes de nitrogênio	46
Figura 8 - Formação de CB com frutose e diferentes fontes de nitrogênio	46
Figura 9 - Produção de CB com diferentes fontes de carbono	48
Figura 10 - Curva TGA de amostras purificadas por diferentes métodos	51
Figura 11 - Derivada TGA de amostras purificadas por diferentes métodos	52
Figura 12 - FTIR de amostras purificadas por diferentes métodos	54
Figura 13 - Curvas TGA (a) e DTG (b) da CB produzida com milhocina	57
Figura 14 - Curvas TGA (a) e DTG (b) da CB produzida com Prodex Lac®	58
Figura 15 - Espectro de FTIR de CB	60
Figura 16 - Micrografia de CB, produzida em meio Controle	60
Figura 17 – Micrografias de CB obtidas a partir de Milhocina	63
Figura 18 – Micrografias de CB obtidas a partir de Prodex Lac®	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre algumas propriedades da celulose vegetal e celulose bacteriana obtida pelo cultivo de <i>G. xylinus</i>	33
Tabela 2 - Amostras para confecção de curva padrão	42
Tabela 3 - Concentração de CB para diferentes meios	47
Tabela 4 - Dados de TGA para membranas de CB purificadas por dois diferentes métodos.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 5 - Dados de FTIR para membranas de CB purificadas por dois diferentes métodos.....	55
Tabela 6 - Dados referentes a consumo de açúcar e produção de CB	56
Tabela 7 - Relação de dados determinados a partir das curvas TGA e DTG	59
Tabela 8 - Dados obtidos da análise de FTIR.....	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Possíveis aplicações de CB	34
Quadro 2 - Resultados obtidos por alguns autores que estudaram a produção de CB alterando meio de cultivo	37
Quadro 3 - Fontes de carbono e nitrogênio estudadas	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
CB	Celulose bacteriana
CCT	Coleção de Cultura Tropical
CS	Celulose sintase
CV	Celulose vegetal
DTG	Derivada termogravimétrica
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Milhocina Frutose
MG	Milhocina Glicose
MGL	Milhocina Glicerol
MI	Milhocina Inulina
ML	Milhocina Lactose
MM	Milhocina Manitol
MS	Milhocina Sacarose
PF	Prodex Lac® Frutose
PG	Prodex Lac® Glicose
PGL	Prodex Lac® Glicerol
PI	Prodex Lac® Inulina
PL	Prodex Lac® Lactose
PM	Prodex Lac® Manitol
PS	Prodex Lac® Sacarose
TGA	Análise termogravimétrica
T-max	Temperatura na qual a taxa de degradação é máxima
T-onset	Temperatura de início de degradação extrapolada
UDP	Uridina Difosfato
UDPG	Uridina Difosfato Glicose

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE QUADROS	11
1 INTRODUÇÃO	15
2 DIAGRAMA CONCEITUAL DE TRABALHO	18
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 REVISÃO DE LITERATURA	22
4.1 Celulose	22
4.1.1 Características químicas e morfológicas da celulose	22
4.2 Celulose bacteriana	25
4.2.1 Microrganismos produtores de celulose bacteriana	25
4.2.2 Metabolismo	26
4.2.3 Condições Nutricionais	29
4.2.4 Condições de cultivo	31
4.2.5 Propriedades da celulose bacteriana (características)	32
4.2.6 Aplicações	33
4.2.7 Perspectivas futuras relatadas	35
4.2.8 Estado da Arte	36
5 METODOLOGIA	38
5.1 Microrganismos	38
5.2 Preparação do inóculo para os experimentos	38
5.3 Obtenção da membrana de celulose	39
5.3.1 Condições de Cultivo	40
5.3.2 Tratamento de purificação	41
5.3.3 Secagem da Membrana	41
5.2 Caracterizações	42
5.2.1 Análise de substrato	42

5.2.2	Análise termogravimétrica - TGA	43
5.2.3	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier - FTIR.....	43
5.2.4	Microscopia eletrônica de varredura - MEV	43
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
6.1	Produção de Celulose Bacteriana	44
6.2	Efeito da fonte de nitrogênio na formação da membrana	45
6.3	Efeito da fonte de carbono na formação da membrana	47
6.4	Avaliação do método de purificação	51
6.5	Caracterizações	55
6.5.1	Substrato	55
6.5.2	Análise termogravimétrica - TGA	57
6.5.3	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier - FTIR....	60
6.5.4	Microscopia eletrônica de varredura - MEV	62
	CONCLUSÕES.....	67
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	68
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE A.....	73

1 INTRODUÇÃO

A celulose representa o biopolímero mais abundante, com produção mundial estimada de 10^{14} toneladas por ano, sendo o principal componente da parede celular de plantas, é um polissacarídeo de cadeia longa composto por anéis de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). Na natureza, a celulose não existe como uma única cadeia. As moléculas, longas e rígidas, de celulose, podem ser encontradas em diferentes formas, estando presente em plantas verdes, fungos e algas marinhas, ou sintetizadas por algumas bactérias (SANTOS; CARBAJO; VILLAR, 2013; DONINI *et al.*, 2010a; RECOUVREUX, 2008).

Vários microrganismos são capazes de sintetizar a celulose bacteriana (CB), dentre estes, a bactéria da espécie *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC 23769) tem sido amplamente citada. Estes microrganismos são inoculados, convencionalmente, em meios que contêm fontes de carbono e fontes de nitrogênio, nutrientes básicos para que ocorra o crescimento da membrana. A produção da celulose bacteriana pode se dar por meio de cultivos estáticos, que são os tradicionais, ou em cultivos dinâmicos, que aceleram a produção. As fontes de carbono comumente utilizadas são glicose, sacarose, maltose, hidrolisados de amido, melaços, etc. Entre as fontes de nitrogênio, utilizam-se sulfato de amônio, cloreto de amônio, fosfato de amônio, nitratos, ureia, peptona ou semelhantes (BYROM, 1993; IGUCHI *et al.*, 1988; RECOUVREUX, 2008).

A importância da celulose bacteriana se dá, justamente, ao considerar suas propriedades, quando comparada com a celulose obtida de plantas (CV), a CB é dita pura, pois a CV apresenta impurezas, como a lignina e a hemicelulose, difíceis de serem removidas, a CB, mesmo que obtida por diferentes formas, possuem a mesma estrutura química, porém, as fibras possuem dimensões nanométricas, conferindo propriedades distintas (DONINI *et al.*, 2010a). Ainda destacam-se entre as propriedades, a permeabilidade,

resistência à tração, resiliência e elasticidade, incluindo a baixa toxicidade e biocompatibilidade (BROWN, 1990; IGUCHI *et al.*, 1988).

Pelas propriedades já citadas, a CB apresenta diversas aplicações, desde biológicas até as mais tecnológicas, fazendo-se presente em inovações, por exemplo, da indústria têxtil, alimentícia, de comunicações e principalmente na área médica. É importante ressaltar, a empregabilidade da CB na biomedicina, pois devido à sua biocompatibilidade com tecidos humanos, é uma alternativa para o tratamento de queimaduras severas ou regeneração tecidual de diversos órgãos, bem como para a engenharia tecidual (DONINI *et al.*, 2010a; RECOUVREUX, 2008).

No âmbito dos estudos envolvendo celulose bacteriana ainda há uma lacuna para encontrar formas viáveis e de baixo custo, para difundir e viabilizar sua produção em maior escala ou prevendo aprimorar as propriedades da mesma. Neste sentido, fazem-se necessárias pesquisas que analisem a melhor condição de cultivo para síntese deste material, buscando meios alternativos, avaliando matérias primas de fontes alternativas ou reaproveitáveis (HUTCHENS *et al.*, 2007; MOHITE & PATIL, 2014b).

Em concordância com o exposto, esta pesquisa propõe avaliar o efeito de diferentes meios de cultura, variando fontes de carbono e de nitrogênio, buscando otimizar a produção de CB. Uma das alternativas a ser estudada como fonte de carbono será o glicerol, coproduto da produção de biodiesel, portanto, uma matéria prima de baixo custo e em abundância; outros açúcares também seguem essa mesma característica, como a frutose e a lactose, os quais também podem ser reaproveitados de resíduos da agroindústria. Como fonte de nitrogênio será avaliada a utilização da milhocina, a qual é resíduo da maceração de milho, podendo ser vantajosa economicamente. Outra alternativa para substituição da fonte nitrogênio será um extrato de levedura bruto, conhecido comercialmente como Prodex Lac®.

As membranas obtidas serão caracterizadas, a fim de conhecer as propriedades obtidas, uma vez que as condições do meio podem influenciar nas características térmicas e físico-químicas, considerando que tais

propriedades poderão direcionar futuros estudos e aplicações nesta área de pesquisa.

2 DIAGRAMA CONCEITUAL DE TRABALHO

Por quê?

- A celulose bacteriana, além de ser uma alternativa à celulose de origem vegetal, apresenta propriedades (pureza, maior cristalinidade e capacidade hidrofílica, entre outras), que proporcionam as mais diversas aplicações, em especial, soluções para biomedicina.
- O alto custo do meio de cultivo da celulose bacteriana é fator que dificulta sua produção em larga escala. Como solução diversas pesquisas buscam alternativas para fonte de carbono e nitrogênio, de forma a reduzir estes custos, tais como a utilização de resíduos agroindustriais ou opções comerciais relativamente mais baratas.
- Considerando as pesquisas de CB em andamento na Univille, faz-se necessário um estudo mais amplo para melhor entender o comportamento de produção e caracterização dos filmes de CB a partir dos meios de cultivo utilizados.

Quem já fez?

- Tabaii e Emtiazi (2016) testaram 8 diferentes fontes de carbono (monossacarídeos: glicose e frutose; dissacarídeos: sacarose e açúcar comestível; álcoois de açúcar: glicerol e manitol; e também soro e amido de qualidade alimentar);
- Lima e colaboradores (2015) caracterizaram membranas de celulose bacteriana (CB) obtidas por cultivo de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769

utilizando suco de caju, extrato de algaroba e líquido de sisal como fontes alternativas;

- Tsouko e colaboradores (2015) substituíram glicose por outras fontes de carbono, tais como xilose, sacarose, frutose, lactose e glicerol;
- Nascimento (2014) avaliou a influência da suplementação do extrato de algaroba na produção de celulose bacteriana;
- Jozala e colaboradores (2014) pesquisaram a produção de CB utilizando como fonte de carbono frutos podres obtidos a partir da eliminação de mercados livres, soro de leite de uma disposição industrial local e a combinação de ambos
- Lestari e colaboradores (2014) analisaram a produção de CB em meio contendo água de coco e sumo de abacaxi;
- Vieira (2013) avalia a formação de CB em meio de folhas de chá verde, resíduos de frutas (abacaxi, mamão, laranja), resíduos de vegetais (beterraba), vinho e colágeno;
- Santos, Carbajo e Villar (2013) analisaram algumas alternativas de fontes de carbono: frutose, sacarose, manitol, glicerol, e também fontes de nitrogênio: asparagina, sulfato de amônio, nitrato de potássio; e extrato de levedura com adição de milhocina;
- ZHONG e colaboradores 2013 investigaram a influência da fonte de carbono na produção de CB;
- Antônio e colaboradores (2012) avaliaram diferentes fontes de carbono (glicerol, glicose e manitol);

Hipóteses

- É possível a produção de celulose bacteriana em diferentes fontes de carbono.
-
- A utilização de Prodex Lac® e milhocina, como fontes alternativas de nitrogênio trarão um incremento na produção de celulose bacteriana

- A caracterização térmica e física da membrana de CB será distinta de acordo com o meio de cultivo utilizado.
- O método de purificação interfere nas propriedades das membranas de CB.

Metodologia

- Avaliar a produção de CB, por *Gluconacetobacter hansenii* tendo como fonte de carbono (glicose, lactose, manitol, frutose, glicerol, inulina) combinadas com duas diferentes fontes de nitrogênio (milhocina e Prodex Lac®).
- Caracterizar as membranas obtidas para verificar se há alteração nas suas propriedades em decorrência do meio de cultivo utilizado;
- Caracterizar as membranas obtidas por diferentes métodos de purificação.

Respostas

- Obter e analisar os gráficos quanto à formação de celulose bacteriana (g/L) em relação as fontes de carbono e nitrogênio utilizadas;
- Analisar, por meio de análise térmica, se os métodos de purificação das membranas resultaram em propriedades diferentes;
- Verificar, por meio da caracterização das membranas obtidas, se as mesmas apresentam características térmicas e físico-químicas conforme descrito em literatura.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os aspectos de produção e caracterizar a celulose bacteriana sintetizada por *Gluconacetobacter hansenii* a partir de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e tratamento de purificação.

3.2 Objetivos específicos

- a) avaliar o uso de milhocina e Prodex Lac® como fonte de nitrogênio na produção de celulose bacteriana;
- b) avaliar o uso de diferentes carboidratos (glicose, lactose, frutose, glicerol, inulina, sacarose e manitol) como fonte de carbono na produção de celulose bacteriana;
- c) avaliar a método de purificação de membrana de CB obtida;
- d) caracterizar a estrutura química, as propriedades térmicas e morfológicas da celulose bacteriana sintetizada a partir de diferentes cultivos, usando as técnicas de TGA, FTIR e MEV;

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Celulose

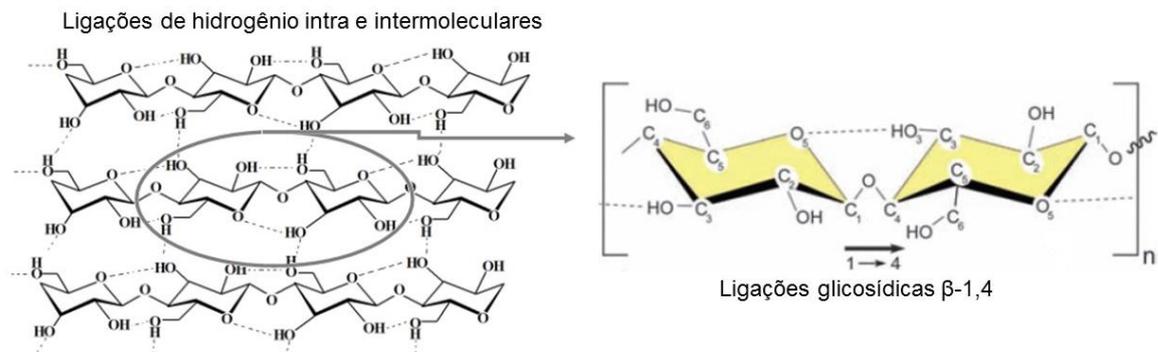
A celulose, representa o biopolímero mais abundante no mundo, sua extração é estimada em mais de 10^{14} toneladas por ano, refletindo em grande importância para diversos setores. A celulose pode ser sintetizada por um grande número de organismos, na maior parte plantas verdes, principalmente árvores e algodão. Visto a maior disponibilidade, a celulose obtida destas fontes é conhecida também por celulose vegetal (CV). Contudo, a celulose também pode ser encontrada em fungos, algas verdes, ou sintetizada por algumas bactérias, esta última, classificada como celulose bacteriana, ou ainda celulose microbiana, em algumas literaturas (BROWN JR., 2004a; DONINI *et al.*, 2010b)

4.1.1 Características químicas e morfológicas da celulose

Sua molécula é expressa quimicamente por $C_6H_{10}O_5$, e sua estrutura é constituída por unidades de β -D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas β -1,4. Na natureza, a celulose não existe como uma única cadeia, as moléculas ligam-se para formar microfibrilas, de forma que essa estruturação proporciona propriedades singulares a celulose. Tais microfibrilas de celulose possuem dimensões, variando de 1 a 25 μ m de largura (o que corresponde a 10 a 250 cadeias). As moléculas de celulose também formam ligações de hidrogênio, denominadas ligações intramoleculares, que conferem rigidez a cadeia, enquanto as ligações intermoleculares formam a fibra vegetal (BROWN JR., 1996; DONINI *et al.*, 2010a; RECOUVREUX, 2008; ROSS; MAYER;

BENZIMAN, 1991; SAMIR; ALLOIN; DUFRENSE, 2005; TAIPINA, 2012). A Figura 1 ilustra como as ligações se dispõem na cadeia polimérica, na qual pode-se notar as ligações de hidrogênio intra e intermolecular, e a estrutura altamente cristalina, bem como visualizar a unidade de repetição (β -D-glicopirranose).

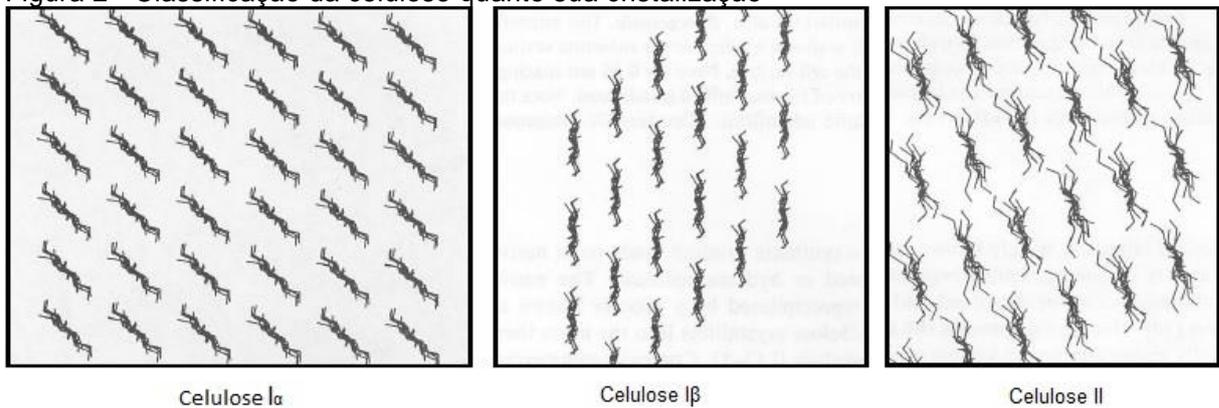
Figura 1 - Representação esquemática da estrutura química, ligações de hidrogênio intra e intermoleculares na celulose cristalina, e unidade de repetição.



Fonte: POLETTI; PISTOR; ZATTERA(2013)

A celulose ainda pode ser classificada quanto sua morfologia em I e II. Celulose I, que é sintetizada por plantas e também pela bactéria *G. xylinus* em cultura estática, é constituída por microfibrilas que se orientam de forma paralela, em contrapartida a celulose II, a qual é sintetizada por um pequeno grupo de organismos vivos, é composta por microfibrilas que se orientam de forma antiparalela. Além disso, a celulose cristalina tipo I apresenta duas formas distintas: I_α e I_β , que consistem de uma cadeia tricíclica e uma cadeia monocíclica, respectivamente (BROWN JR., 1996; DONINI *et al.*, 2010b). Tais diferenças morfológicas oriundas da orientação das microfibrilas são ilustradas na Figura 2.

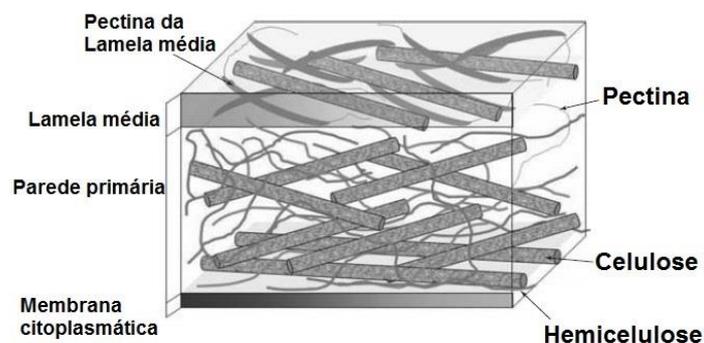
Figura 2 - Classificação da celulose quanto sua cristalização



Fonte: Adaptado (BROWN JR., 1996)

Atualmente a madeira do eucalipto tem sido uma das principais fontes, para fins industriais, de celulose. Porém, o composto extraído da planta apresenta naturalmente impurezas associadas à sua composição, sendo que a celulose representa cerca de 40% desse montante, a lignina e a hemiceluloses podem somar juntas 55%, e outros componentes advindos da extração também estão presentes, em pequena porcentagem. A remoção dessas impurezas químicas para obter celulose pura pode tornar o processo complexo e oneroso (DONINI *et al.*, 2010a). A Figura 3 mostra a celulose juntamente com os demais componentes presentes na celulose advinda de origem vegetal, na qual estão presentes as estruturas da lamela de pectina, pectina e hemicelulose.

Figura 3 – Representação dos componentes presentes na celulose vegetal



Fonte: Pecoraro *et al.* (2008)

4.2 Celulose bacteriana

O relato de síntese de celulose bacteriana por *Acetobacter xylinum* foi descrito pela primeira vez em 1886 por A. J. Brown, quando este observou a formação de uma fina membrana na interface líquido-ar. Porém estudos intensivos sobre a síntese CB, utilizando *A. xylinum* como uma bactéria modelo, tiveram início somente em 1947 por Hestrin e colaboradores que demonstraram que essas bactérias são capazes de sintetizar celulose na presença de glicose e oxigênio (BIELECKI; KRYSZYNOWICZ; MARIANNA, 2004; BROWN JR., 1989).

Para sintetizar CB diversos fatores devem ser considerados, tais como o microrganismos produtor, as condições nutricionais e o meio de cultivo.

4.2.1 Microrganismos produtores de celulose bacteriana

Vários microrganismos são capazes de sintetizar CB, conforme relatado por Chawla e colaboradores (2009). Segundo o autor, bactérias das espécies *Gluconacetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Rizobium*, *Sarcina* e *Salmonella* podem produzir CB, dentre estas, as bactérias da espécie *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC 23769) tem sido amplamente citada em estudos de produção da mesma.

Os estudos referentes a obtenção de CB iniciaram utilizando a bactéria *Acetobacter xylinum*. Um estudo filogenético desenvolvido por Yamada e Hoshino (1997) reclassificou essa bactéria, incluindo-a no novo gênero *Gluconacetobacter*, como *Gluconacetobacter xylinus*. Também foram incluídas nesse gênero outras espécies, como: *G. hansenii*, *G. europaeus*, *G. oboediens*

e *G. intermedius* (YAMADA; HOSHINO; ISHIKAWA, 1997). Recentemente, Yamada e colaboradores (2012) propuseram uma nova classificação, onde passaram a denominar a bactéria como *Komagataeibacter hansenii*.

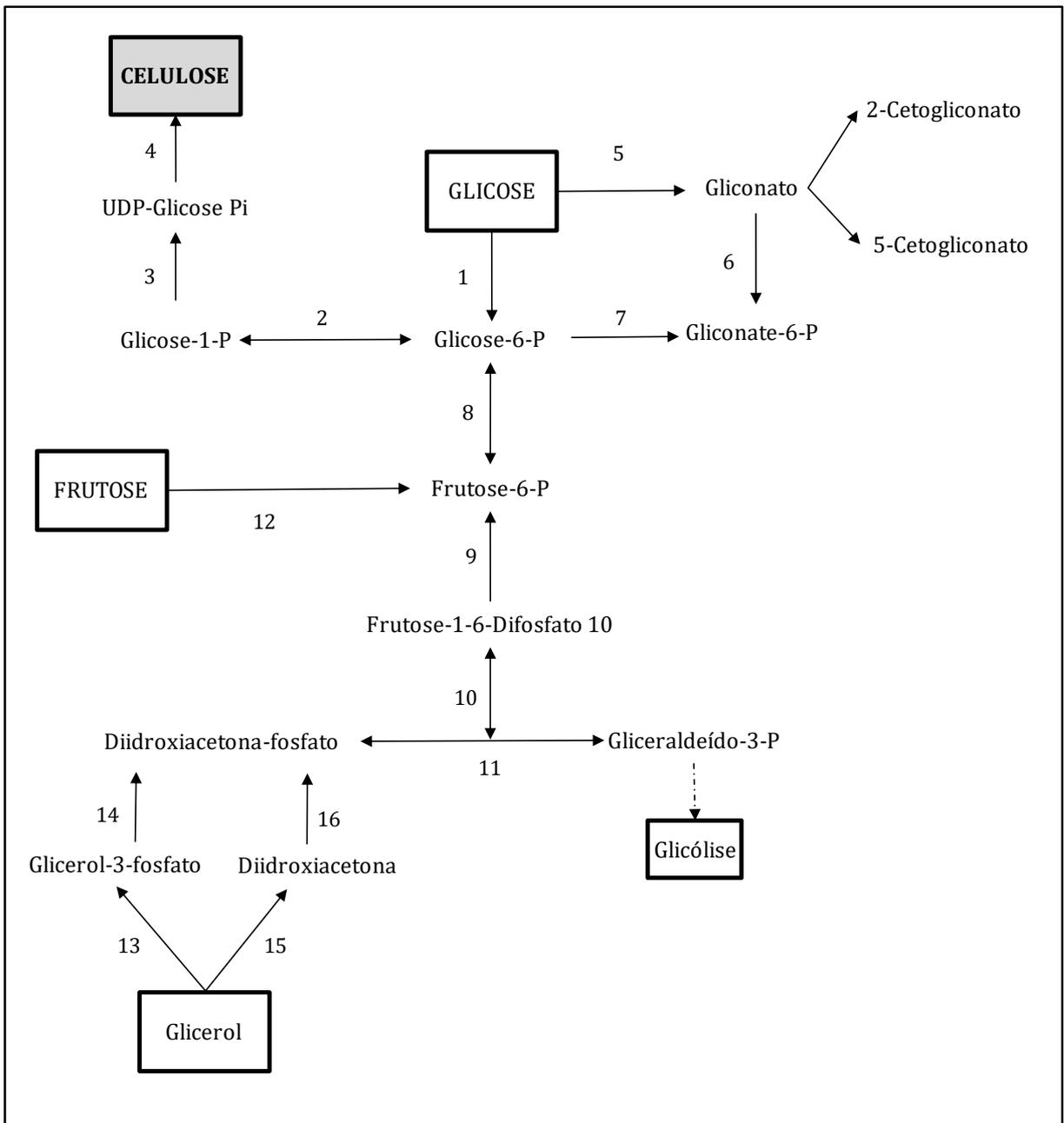
G. hansenii é uma bactéria Gram-negativa, estritamente aeróbica, não-patogênica, comumente encontradas em frutas, vegetais, no vinagre e em bebidas alcoólicas. Destaca-se dentre os microrganismos como a que possui maior potencial de produção de celulose, sendo que uma única célula pode converter até 108 moléculas de glicose por hora em celulose (BROWN JR., 2004b; PECORARO *et al.*, 2008; RECOUVREUX, 2008). A espécie *G. hansenii* apresenta morfologia de bastonetes retos ou ligeiramente curvos, alongados variando de 0,6 a 0,8 x 10⁻⁴ µm, podendo ser ou não móveis, a faixa de temperatura para crescimento fica entre 15 e 34 °C, e temperatura para inativação entre 65 e 70 °C (KLEMM *et al.*, 2005).

Provavelmente decorrente do seu mecanismo aeróbio, produz uma membrana de celulose na interface líquido-ar do meio de cultivo. *G. hansenii* produz celulose extracelular livre de lignina ou hemicelulose, tornando-a uma excelente fonte de celulose pura. Ela é capaz de converter várias fontes de carbono em celulose, mas o seu mecanismo de síntese ainda não foi completamente elucidado; presume-se, no entanto, que seja semelhante ao da *Gluconacetobacter xylinus*, que começa sempre com o precursor de UDP-glicose e termina formando uma cadeia polissacarídica (BROWN JR., 2004b; IGUCHI *et al.*, 1988).

4.2.2 Metabolismo

A síntese da celulose pelas bactérias compreende um processo composto de várias etapas, que envolve um grande número de enzimas individuais e complexos de proteínas catalíticas e regulatórias. A Figura 4 elucidada a via de biossíntese de celulose bacteriana, ilustrando todos as etapas do processo.

Figura 4 - Via de biossíntese de celulose



Fonte: Adaptado de (RECOUVREUX, 2008). Enzimas: (1) glicoquinase; (2) fosfoglicomutase; (3) UDP-glicose- pirofosforilase; (4) celulose sintase; (5) glicose oxidase; (6) gliconoquinase; (7) glicose-6- fosfato desidrogenase; (8) fosfoglicoisomerase; (9) frutose bisfosfatase; (10) frutose-1,6- bisfosfato aldolase; (11) triose fosfato isomerase; (12) frutoquinase; (13) glicerol quinase; (14) glicerol-3-fosfato desidrogenase; (15) glicerol oxidase; (16) diidroxiacetona quinase.

De forma geral, pode-se resumir o processo em três etapas principais:

- 1º. Formação das cadeias β - (1 \rightarrow 4) advindas da fonte de carbono;
- 2º. Secreção extracelular das cadeias lineares;
- 3º. Organização e cristalização das cadeias de glucanas, por meio de ligações de hidrogênio (BIELECKI; KRYSZYNOWICZ; MARIANNA, 2004; DONINI *et al.*, 2010a).

A bactéria *G. xylinus* tem a capacidade de utilizar uma variedade de substratos carbônicos para a biossíntese de celulose. Entretanto a via bioquímica mais compreendida envolve a conversão da glicose como substrato exógeno à celulose (RECOUVREUX, 2008)

A síntese de celulose por *G. xylinus* tem início no transporte do meio externo para o citoplasma da bactéria ou de fontes internas. A conversão da glicose transportada do meio externo para o citoplasma bacteriano é catalisada por quatro enzimas, sendo elas: Glicoquinase, que é a enzima responsável pela fosforilação do carbono 6 da glicose, a Fosfoglicomutase que catalisa a reação de isomerização da glicose-6-fosfato para glicose-1-fosfato, a UDPG-pirofosforilase (glicose-1-fosfato-uridililtransferase) que sintetiza a UDP - glicose (UDPG) e a Celulose Sintase (CS) que produz a celulose a partir de UDP-glicose. A síntese da celulose, a partir de fontes endógenas, se dá a partir da gliconeogênese que, em *G. xylinus*, ocorre a partir do oxalacetato, via piruvato, devido a um mecanismo de regulação não comum das enzimas oxalacetato descarboxilase e a piruvato fosfato diquinase, que converte o piruvato a fosfoenolpiruvato. A reação de síntese de CB constitui um processo oneroso para a célula, consumindo cerca de 10% da adenosina trifosfato (ATP) gerada no metabolismo bacteriano. Assim, a energia empregada para a síntese da CB é proveniente do metabolismo aeróbio (BIELECKI; KRYSZYNOWICZ; MARIANNA, 2004).

Neste contexto, a membrana de CB começa a se formar quando cada bactéria dá origem a cadeias que se agregam formando subfibrilas com largura de, aproximadamente, 1,5 nm. Estas, posteriormente agrupam-se com outras

36 iguais a elas, forma-se então uma fibrila elementar com um diâmetro de 3,5 nm. Demais fibrilas adjacentes juntam-se por meio de ligações de hidrogênio formando um “ribbon”. Esses ribbons atingem comprimentos que variam entre 1 e 9 µm, e formam uma estrutura reticulada densa, que é estabilizada por meio ligações de hidrogênio (PECORARO *et al.*, 2008)

É importante salientar que, durante o processo de formação, a celulose é formada somente nas áreas próximas da superfície e não em todo o meio de cultivo. Enquanto o sistema for mantido imóvel, a membrana se mantém suspensa na parede interna do frasco por coesão. A espessura da membrana estabiliza-se, se for usado um frasco de boca cônica, ou se o recipiente que contém o meio, for agitado. Nestas duas situações, a membrana formada, vai para o fundo do frasco e uma nova começa se formar na superfície do meio de cultivo. As bactérias contidas na membrana podem ser facilmente removidas, pela imersão em soluções alcalinas diluídas em água (IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000).

4.2.3 Condições Nutricionais

O método para a produção de celulose bacteriana equipara-se ao modo convencional para a cultura de bactérias. Ou seja, microrganismos são inoculados em meios nutrientes convencionais, que contêm fontes de carbono, fontes de nitrogênio, sais inorgânicos, e, se necessário, outros nutrientes orgânicos tais como aminoácidos, vitaminas, etc. Como fontes de carbono, têm-se: glicose, sacarose, maltose, hidrolisados de amido, melaços, entre outros. Como fontes de nitrogênio destacam-se sais de amônio, sulfato de amônio, cloreto de amônio, fosfato de amônio, nitratos, ureia, peptona ou semelhantes. Os sais inorgânicos, mais comuns, fosfatos, sais de magnésio, sais de cálcio, sais de ferro, sais de manganês, podem ser adicionados. Como nutrientes orgânicos, aminoácidos, vitaminas, ácidos graxos, ácidos nucléicos,

extratos de leveduras, proteína de soja hidrolisada. A busca pela otimização nas condições de cultivo faz-se necessária, visto que esta influencia diretamente na produção de celulose (CHAWLA *et al.*, 2009; IGUCHI *et al.*, 1988).

Segundo Chawla e colaboradores (2009) o nitrogênio é um componente principal, muito importante no metabolismo celular, e compreende entre 8 e 14% da massa celular seca de bactérias. Os autores verificaram que o efeito de várias fontes de nitrogênio sobre a produção de celulose bacteriana tem sido relatado, e citaram, como exemplo, estudos que avaliaram a eficiência de hidrolisado de caseína e peptona.

Dentre os substratos necessários para síntese de CB, vale ressaltar aqueles provenientes de resíduos industriais, como a milhocina. A milhocina advém da água utilizada na maceração do milho, quando na processamento por via úmida. Após a limpeza e secagem, o milho é macerado, separado em germe, fibras e endosperma (FALLIS, 2013). Este substrato contém grande quantidade de nitrogênio, aminoácidos entre outros nutrientes, sendo utilizado principalmente como alimento complementar na fabricação de ração e também como fonte de nutrientes em processos fermentativos (ZANOTTO, 2011).

Tal reaproveitamento é interessante visto a larga produção. O milho, é uma das principais culturas produzidas no país. Juntamente com a soja, corresponde a quase 90% do que é produzido em grãos. Para o milho, a produção estimada em 2017 é de 93,8 milhões de toneladas, distribuídas entre primeira safra (30,3 milhões de toneladas) e segunda safra (63,5 milhões de toneladas) (CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2017).

Outra alternativa encontrada, é o Prodex Lac®, um extrato de levedura bruto, utilizado como fonte de vitaminas de baixo custo em substituição ao extrato de levedura purificado (MICHALSKI *et al.*, 2008).

4.2.4 Condições de cultivo

A celulose bacteriana apresenta uma gama de opções acerca das suas condições de cultivo, as convencionalmente usadas incluem cultura estática ou cultura agitada, enquanto que os métodos de operação usuais incluem processo em batelada, processo em batelada alimentada, processo repetido em batelada ou processo contínuo (TAKEMURA; JP, 2004). Dentre os parâmetros a serem controlados, estão a temperatura e o pH do meio.

Tradicionalmente, a cultura é desenvolvida em bandejas rasas, como placas de Petri, ou em recipientes como Erlenmeyers, permanecendo cobertas por um período de 7 a 20 dias, até que uma membrana cubra a superfície do meio de cultivo da bandeja. A produção da celulose bacteriana pode se dar por cultivos estáticos, que são os tradicionais, simples e com menor custo, ou em cultivos dinâmicos, que aceleram a produção (BYROM, 1993; IGUCHI *et al.*, 1988; RECOUVREUX, 2008).

A escolha pelo tipo de cultivo irá refletir na estrutura morfológica de celulose obtida. Na cultura estacionária, o resultado é acumulação de uma membrana gelatinosa de celulose sobre a superfície do meio; enquanto na cultura agitada, a celulose sintetizada surge sob a forma de suspensões, pastilhas, ou esferas fibrosas irregulares. O cultivo também influenciará nas propriedades físicas da CB, uma vez que o cultivo estático proporciona uma membrana com estrutura mais cristalina. O cultivo sob agitação ainda requer muitos estudos, pois mesmo diante de algumas vantagens, apresenta diversos problemas, como a instabilidade da estirpe, o comportamento não-newtoniano durante a mistura da celulose bacteriana, ou fornecimento inadequado de oxigênio (CZAJA, ROMANOVICZ & BROWN, 2004).

4.2.5 Propriedades da celulose bacteriana (características)

A celulose sintetizada por bactérias é idêntica a produzida por plantas, quanto à sua fórmula molecular e estrutura polimérica, porém apresenta uma cristalinidade mais elevada. Outra forte característica da CB é sua pureza, pois em contraste com a celulose obtida das plantas, a celulose sintetizada por bactérias é isenta da presença de lignina e hemicelulose, componentes difíceis de serem retirados e que restringem seu uso (PECORARO *et al.*, 2008; PETERSEN; GATENHOLM, 2011).

Conforme revisão feita por Donini e colaboradores (2010a), a alta resistência mecânica da CB, é uma propriedade conferida pelas fibras de dimensões nanométricas, e permitem diversas.

Devido às características hidrofílicas, a CB liga-se fortemente com a água e comporta-se, assim, como um hidrogel. Membranas de celulose bacteriana têm excelentes propriedades absorventes de líquidos, possibilitando emprego numa grande variedade de aplicações médicas. Em contraste com muitos polímeros sintéticos, a celulose bacteriana tem capacidade de integrar-se com demais tecidos, visto que possui propriedades mecânicas únicas, que são semelhantes aos tecidos moles (BYROM, 1993; PETERSEN; GATENHOLM, 2011).

Ainda destacam-se, entre as propriedades, a permeabilidade, resistência à tração, resiliência e elasticidade, incluindo a baixa toxicidade (BROWN, 1990; IGUCHI *et al.*, 1988). Todos estes diferenciais citados permitem à CB uma grande possibilidade de aplicações e inovações biotecnológicas.

A Tabela 1 traz um comparativo entre as propriedades da celulose, obtidas de ambas as fontes, onde pode-se notar as diferenças citadas pelos autores.

Tabela 1 - Comparação entre algumas propriedades da celulose vegetal e celulose bacteriana obtida pelo cultivo de *G. xylinus*

PROPRIEDADE	CELULOSE VEGETAL	CELULOSE BACTERIANA
Largura da fibra	1,4 – 4,0x10 ⁻² mm	70–80 nm
Cristalinidade	56 – 65%	65 – 79%
Grau de polimerização	13000 – 14000	2000 – 6000
Módulo de elasticidade	5,5 – 12,6 GPa	15 – 30 GPa
Teor de água	60%	98,50%

Fonte: adaptado de (PECORARO *et al.*, 2008)

4.2.6 Aplicações

Devido às suas características, a celulose bacteriana vem sendo empregada em diversas inovações, desde biológicas, até as mais tecnológicas. Apesar do contexto inovador, conforme descrito por Chawla e colaboradores (2009) uma das primeiras aplicações da CB foi na área alimentícia, no uso na produção da nata de coco, alimento popularmente conhecido na região das Filipinas.

Outro estudo que demonstra as aplicações da celulose bacteriana, foi feito por Mohite e Patil (2014a), e ressalta o uso da CB na área biomédica, como por exemplo, na regeneração tecidual e substituição de vasos sanguíneos, entre outras inovações da engenharia de tecidos. Pode-se dizer que a CB satisfaz os requisitos necessários para ser considerada um curativo moderno para o tratamento de ferimentos. Devido a sua porosidade, a membrana de CB é capaz de permitir a transferência de antibióticos e outros medicamentos para o ferimento e funcionando como uma barreira física a entrada de corpos estranhos na ferida (CZAJA *et al.*, 2006). Estes autores também citam a utilização de CB em cosméticos e fármacos e na remoção de alguns corantes e metais (CZAJA *et al.*, 2006). Outra interessante aplicação, a qual acentua a versatilidade deste componente, é na área de eletrônicos.

Donini e colaboradores (2010) compilaram as diversas aplicações da CB, e estas estão presentes no Quadro 1.

Quadro 1 - Possíveis aplicações de CB

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

Fonte: Adaptado de (DONINI *et al.*, 2010a)

Diante de toda esta variedade de aplicações é possível concluir que a celulose bacteriana é um material muito versátil, aplicado principalmente em inovações e soluções de grande importância para a sociedade.

4.2.7 Perspectivas futuras relatadas

Apesar do seu enorme potencial, o alto custo de produção CB é a principal desvantagem que dificulta a aplicação industrial em larga escala. A utilização de resíduos e subprodutos como meios de cultivo podem melhorar a relação custo-benefício da produção CB. Nos últimos anos, muitos estudos buscam encontrar novos meios de produção de baixo custo para a produção de celulose bacteriana (TSOUKO *et al.*, 2015).

Muitos cientistas já estão tentando desenvolver novos biomateriais de polímeros sintéticos. Estes novos materiais podem ser usados em muitas aplicações biomédicas e de biotecnologia, tais como engenharia de tecidos, de administração de fármaco, implantes médicos, entre outros. Vários estudos indicam que a celulose bacteriana é um melhor candidato nesta área de aplicações, uma vez que, é ao mesmo tempo um material durável e biocompatível. Na verdade, celulose bacteriana é um material particularmente interessante para o desenvolvimento de muitos dispositivos biomédicos diferentes (CZAJA *et al.*, 2007; MOHITE; PATIL, 2014b; RECOUVREUX, 2008; SOUZA, 2012)

A produção em larga escala de CB parece ser bastante viável, no entanto, os detalhes específicos de engenharia precisam ser elaborados. Além disso, investigações bioquímicas e genéticas precisam ser conduzidas de modo a compreender e melhorar o processo de produção de celulose. Pesquisas interdisciplinares são necessárias, a fim de trazer produtos de celulose bacteriana para a comercialização bem-sucedida. Um controle firme sobre parâmetros estruturais poderá resultar no aumento do número de aplicações em um futuro próximo. A possibilidade de produzir CB em larga escala com êxito, o tornará um biomaterial imperativo, utilizado na criação de uma vasta variedade de dispositivos e produtos inovadores (MOHITE; PATIL, 2014b).

4.2.8 Estado da Arte

Antônio e colaboradores (2012) avaliaram a produção de CB com *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769, variando fontes de carbono (glicerol, glicose e manitol), e observaram que a produção de celulose foi de 6,9 g/L, para glicose e manitol, e quando glicerol foi utilizado, esta foi igual a 9,0 g/L. Os autores concluem que glicerol é uma alternativa viável, rentável e de baixo custo para obtenção de celulose bacteriana.

Tsouko e colaboradores (2015) obtiveram os melhores resultados com glicerol e com sacarose comercial, os quais levaram às maiores concentrações de CB, 3,2 e 4,9 g/L, respectivamente. Quando a frutose foi utilizada como fonte de carbono, a concentração obtida foi de 2,06 g/L. A xilose e a lactose não foram eficientemente metabolizadas, resultando em baixa produção de CB, e a menor produção foi encontrada no meio contendo glicose.

Santos, Carbajo e Villar (2013) produziram membranas de CB alterando fontes de carbono (frutose, sacarose, manitol ou glicerol) e fontes de nitrogênio (asparagina, extrato de levedura, milhocina, amônio inorgânico e nitrato de potássio). E observaram que nas condições avaliadas, frutose mostrou-se mais eficiente na formação de membrana em comparação aos demais açúcares, e como fonte de nitrogênio, extrato de levedura juntamente com milhocina apresentou melhores resultados.

Tabaie e Emtiazi (2016) também relatam melhores resultados, na produção de CB, com glicerol (cerca de 9 vezes) em comparação com o meio de glicose, em todas as cepas utilizadas, seguido de manitol e frutose para duas cepas recentemente isoladas e glicose para *G. xylinus* (PTCC 1734). Não houve diferenças significativas entre sacarose comercial (açúcar) e sacarose pura na produção de CB. Soro de leite e amido de qualidade alimentar não se mostraram adequados.

O Quadro 2 apresenta uma síntese dos principais resultados obtidos por alguns autores que estudaram a obtenção de CB em diferentes meios de cultivo.

Quadro 2 - Resultados obtidos por alguns autores que estudaram a produção de CB alterando meio de cultivo

Referência	Bactéria	Condições fixas	Condições variáveis	Principais resultados (g/L de CB)
ANTÔNIO <i>et al</i> (2012)	<i>Gluconacetobacter hansenii</i> ATCC23769	<ul style="list-style-type: none"> • 5 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de Peptona e 25 g/L de uma das fontes de carbono • 12 frascos erlenmeyers de 125 mL • Estático, 30 °C. • 14 dias 	<ul style="list-style-type: none"> • Fontes de carbono: glicerol, glicose e manitol 	<ul style="list-style-type: none"> • Com glicose e manitol: 6,9 g/L de CB; • Com Glicerol: 9 g/L de CB;
SANTOS, S. M.; CARBAJO, J. M.; VILLAR, J. C. (2013)	<i>Sucrofermentans Gluconacetobacter</i> CECT 7291	<ul style="list-style-type: none"> • A celulose foi cultivada pelo método de Schramm e Hestrin • 100 ml de meio líquido em placas de Petri de 150 mm, • Condições estáticas, 30 °C • 13 dias 	<ul style="list-style-type: none"> • Fonte de Carbono: frutose, Sacarose, manitol ou glicerol; • Fontes de nitrogênio: asparagina, extrato de levedura, milhocina, amônio inorgânico e nitrato de potássio. 	<ul style="list-style-type: none"> • Melhor resultado para fonte de carbono é frutose, 2,7 g/L de CB; • Como fonte de nitrogênio, destaca-se extrato de levedura juntamente com milhocina, 3 g/L de CB;
TSOUKO, E. <i>et al.</i> (2015)	<i>Komagataeibacter sucrofermentans</i> DSM 15973	<ul style="list-style-type: none"> • Meios: 20 g / L de glicose, peptona 5 g / L, extrato de levedura 5 g / L, 2,2 g / L de Na₂HPO₄, 1,15 g / L de ácido cítrico (meio HS); • Frascos Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de volume de trabalho a 30 ° C. O volume do inóculo foi de 10% (v / v) • pH 6 • 15 dias 	<ul style="list-style-type: none"> • Fontes de carbono: xilose, sacarose, frutose, lactose e glicerol bruto. 	<ul style="list-style-type: none"> • Xilose e a lactose: 1,7 e 1,6 g / L, respectivamente. • Glicose: 1,2 g / L) • Frutose: 2,06 g / L • Glicerol bruto e a sacarose comercial: 3,2 e 4,9 g / L, respectivamente.
TABAIL, M. J.; EMTIAZI, G. (2016)	<i>G. xylinus</i> (strain number 1734) (A2 e S) outras duas cepas isoladas recentemente	<ul style="list-style-type: none"> • Meio de Hestrin-Schramm (HS) composto por D-Glicose (20 g/L), peptona (5 g/L), extrato de levedura (5 g/L), Na₂HPO₄ (2,7 g/L) e ácido cítrico (1,15 g/L) pH 6,0 • 28 °C por 20 dias. • Condição estática 	<ul style="list-style-type: none"> • Fontes de carbono, glicose, frutose, sacarose e sacarose alimentar, glicerol e manitol, soro de leite e amido de qualidade alimentar. 	<ul style="list-style-type: none"> • O glicerol deu o maior rendimento relativo, seguido de manitol e frutose • Não houve diferenças significativas entre sacarose (comercial) e sacarose na produção de CB. • Soro de leite e amido de qualidade alimentar não foram adequadas fontes de carbono.

5 METODOLOGIA

5.1 Microrganismos

Para a avaliação da produção de CB, o microrganismo utilizado foi a bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, linhagem ATCC 23769, obtida da "Coleção da Cultura Tropical (CCT)" (Fundação André Tosello), Campinas/SP. Os microrganismos permaneceram armazenados em eppendorf a -80 °C contendo 500 µL de glicerol 40 % e 500 µL de suspensão em meio de cultivo com a seguinte composição: manitol (20 g/L), extrato de levedura (5 g/L) e peptona (5 g/L).

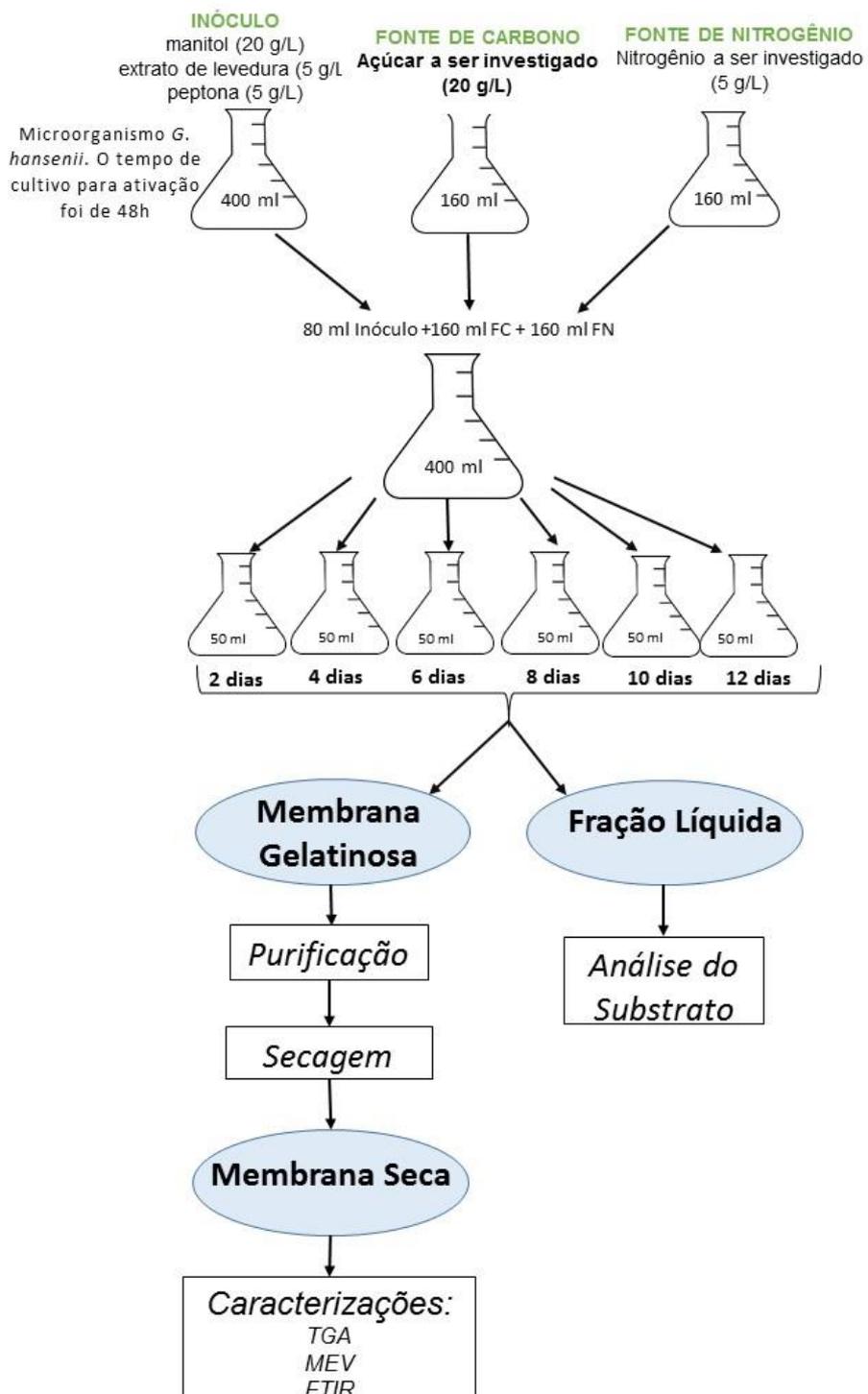
5.2 Preparação do inóculo para os experimentos

O inóculo foi cultivado em frasco Erlenmeyer de 1000 mL contendo 400 ml de meio de cultura com a seguinte composição: manitol (20 g/L), extrato de levedura (5 g/L) e peptona (5 g/L). Os compostos foram resuspenso em água e posteriormente esterilizados em autoclave. Ao meio de cultivo esterilizado foi adicionado o conteúdo de 1 eppendorf contendo o microrganismos *G. hansenii*. O tempo de cultivo para ativação foi de 48h em condição estática.

5.3 Obtenção da membrana de celulose

O fluxograma da etapa de produção de cada membrana de CB está ilustrado na Figura 5

Figura 5 - Fluxograma de obtenção de CB



5.3.1 Condições de Cultivo

Após o cultivo, as células foram transferidas a uma taxa de inóculo de 20 % para um frasco de Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio, com a seguinte composição: 20 g/L do açúcar a ser investigado, 5 g/L de Prodex Lac® (autolisado de leveduras, fonte de nitrogênio) ou 5 g/L milhocina (água de maceração do milho, fonte de nitrogênio) conforme Quadro 3. O cultivo foi mantido estático, a 30° C. A cada 2 dias, um frasco de cada meio, foi retirado para remover a membrana formada, e colher amostra do meio para análise de substrato. As membranas foram recuperadas conforme item 5.3.2.

Quadro 3 – Composição dos meios de cultivo

Fonte de nitrogênio (5 g/L)	Fonte de carbono (20g/L)	Meio
Extrato de levedura + Peptona	Manitol	CONTROLE
Milhocina	Frutose	MF
	Glicose	MG
	Glicerol	MGL
	Inulina	MI
	Lactose	ML
	Manitol	MM
	Sacarose	MS
Prodex Lac®	Frutose	PF
	Glicose	PG
	Glicerol	PGL
	Inulina	PI
	Lactose	PL
	Manitol	PM
	Sacarose	PS

5.3.2 Tratamento de purificação

Método 1: a membrana de celulose foi lavada com água deionizada e transferido para 5 ml de NaOH 0,1 M por 48 h para dissolução das células bacterianas. Em seguida as membranas foram colocadas em banho maria a 80 °C por 20 min. A membrana foi então lavada com água deionizada abundantemente por repetidas vezes para remover restos celulares bacterianos e o excesso de NaOH.

Método 2: a membrana de celulose foi lavada com água deionizada e transferida para 5 ml de NaOH 0,1 M a 80 °C por 1 h para dissolução das células bacterianas. Em seguida a membrana foi então lavada com água deionizada abundantemente por repetidas vezes para remover restos celulares bacterianos e o excesso de NaOH. O processo de lavagem é finalizado quando o pH da água de lavagem estiver com pH entre 6,5 e 7,0

5.3.3 Secagem da Membrana

As membranas obtidas a partir dos diferentes cultivos e processos de recuperação foram previamente secas à vácuo, em temperatura de 30 °C por 48 horas, e caracterizadas por TGA, FTIR E MEV, conforme descrito a seguir.

5.2 Caracterizações

5.2.1 Análise de substrato

Para determinação do consumo de açúcar ao longo da formação de CB foram recolhidos 2mL do meio de cultivo em 0, 6 e 12 dias. A determinação dos açúcares (glicose, frutose e lactose) foi realizada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por (MILLER, 1959). A curva de calibração foi feita a partir de 7 pontos, com as concentrações descritas nas Tabela 2.

Tabela 2 - Amostras para confecção de curva padrão

Amostra	Concentração de açúcar (g/L)
P1	0
P2	0,25
P3	0,5
P4	0,75
P5	1
P6	1,5
P7	2

As amostras foram preparadas contendo de 1 mL da solução com o açúcar redutor a ser investigado, ao qual foi adicionado 1 mL do reagente DNS e levados a fervura em banho-maria durante 5 minutos. Decorrido este tempo, as amostras foram resfriadas e adicionados 10 mL de água destilada e, realizadas as leituras em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650 PC) em 540 nm. O equipamento foi calibrado com uma amostra contendo apenas água e reagente DNS, processada da mesma forma que as demais amostras.

Os cálculos das quantidades de açúcar redutor (mL/amostra) foi realizado a partir da equação da reta, de uma curva de calibração, utilizando o software Excel.

5.2.2 Análise termogravimétrica - TGA

As análises de TGA foram realizadas em equipamento da TA Instruments modelo TGA-Q50 no Laboratório de Materiais da Univille. As amostras foram aquecidas de 25 a 600 °C a 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio. Os parâmetros experimentais foram ajustados no *software* TA - *Universal Analysis* e representados graficamente para interpretação.

5.2.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier - FTIR

Os espectros das membranas foram obtidos em equipamento *Perkin Elmer Frontier* no laboratório de materiais da Univille. Foram realizadas 16 varreduras por amostra, de 500 a 4000 cm^{-1} , no modo de refletância total atenuada (ATR – *attenuated total reflectance*).

5.2.4 Microscopia eletrônica de varredura - MEV

Fragmentos das membranas de CB foram fixados em um suporte metálico e recobertos com uma fina camada de ouro, utilizando-se um metalizador de amostras BAL-TEC SCD 050 e foram observados ao microscópio eletrônico de varredura (SEM) do Laboratório de Caracterização da UDESC, em um equipamento Zeiss DSM 940A, sob tensão de 10 kV, e ampliação de 10.000 vezes.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Produção de Celulose Bacteriana

A Figura 6 ilustra os frascos contendo meio de cultura de *Gluconacetobacter hansenii* (a), e as películas de CB resultantes das membranas secas em estufa (b).

Figura 6 - Produção de CB. a) Cultura de CB; b) películas de CB secas



(a)



(b)

O meio de cultivo da *Gluconacetobacter hansenii* (Figura 6-a) pode ser proveniente de variadas fontes e o tempo de cultivo conforme observado na literatura, também pode variar, usualmente, é mantida entre 5 a 12 dias (ANTÔNIO, 2012). O meio e o tempo de cultivo influenciam diretamente nas características de espessura, coloração e transparência das membranas de CB (RECOUVREUX, 2008; SANTOS, 2012). O tempo de cultivo utilizado no presente estudo foi de 12 dias, para a observação do crescimento de massa das membranas neste intervalo. Estas membranas se mostraram gelatinosas, porém com estrutura bastante resistente à

ruptura a tração manual. Na Figura 6-b pode-se observar as películas de CB após secas em estufa, as quais apresentam espessura mais fina, devido a perda de água, têm uma coloração branca/amarela, e possuem forma com dimensões aproximadas ao Erlenmeyer em que foram cultivadas.

6.2 Efeito da fonte de nitrogênio na formação da membrana

As curvas de formação de membrana CB obtidas com diferentes fontes de nitrogênio podem ser observadas na Figura 7. Conforme mostra a figura, houve formação da CB para ambas fontes de nitrogênio analisadas, independentemente da fonte de carbono. No entanto, com a fonte Prodex Lac® observou-se maiores concentrações.

Santos e colaboradores (2013), que também investigaram algumas fontes de nitrogênio, concluíram em seus estudos que combinações de nitrogênio proporcionam incremento de produtividade, o meio contendo milhocina e extrato de levedura, produziu o maior rendimento na produção de CB, com valores em torno de 3,0 g/L no final dos experimentos, maior que todas as demais fontes analisadas pelos autores.

Na literatura levantada, não foram encontrados estudos que avaliassem a produção de CB com Prodex Lac®, porém o bom desempenho deste pode ser justificado por tratar-se de extrato de levedura bruto, e o meio convencional para cultivo de CB usa como fonte de nitrogênio extrato de levedura purificado e peptona, portanto, entende-se que Prodex Lac® resulta em um meio mais rico em nitrogênio, isso fica mais evidente quando analisamos a Figura 8, na qual nota-se que apresenta uma curva de crescimento semelhante ao controle.

Figura 7 - Formação de CB para diferentes fontes de nitrogênio

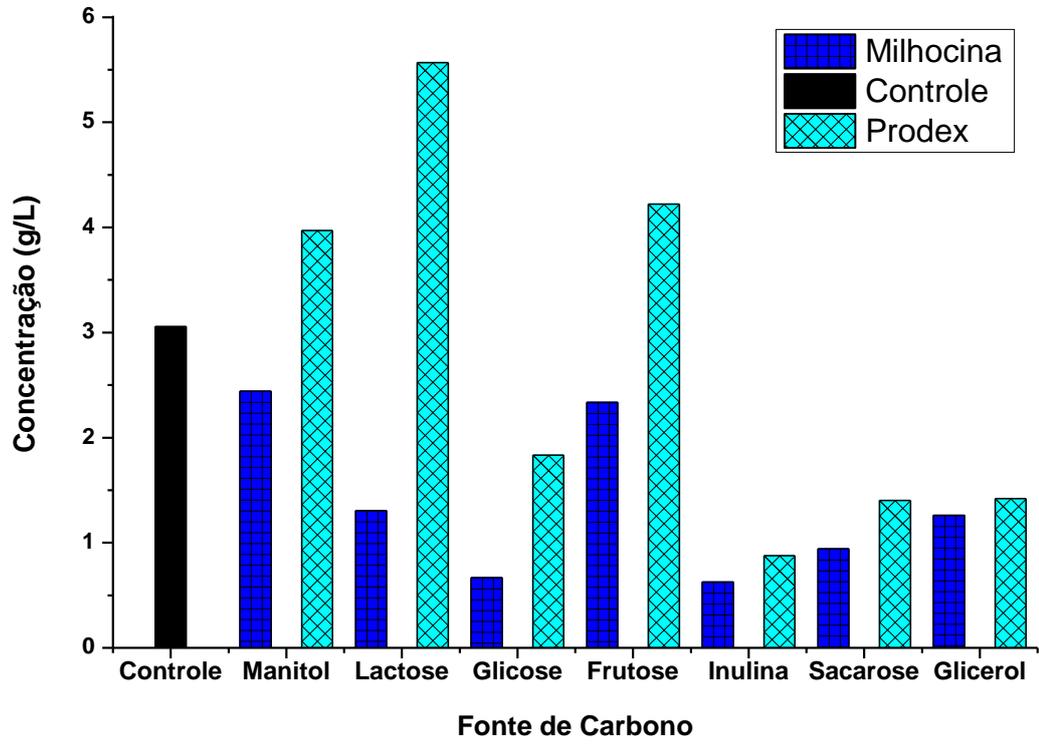
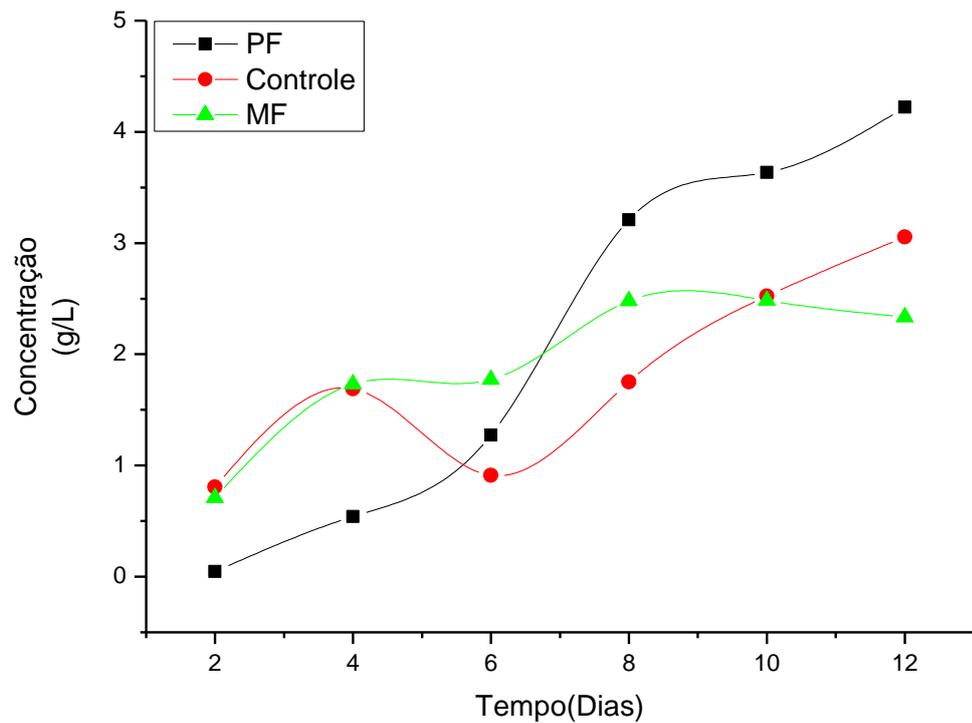


Figura 8 - Formação de CB com frutose e diferentes fontes de nitrogênio



No gráfico é possível verificar como se apresenta o crescimento de CB com frutose e as duas fontes de nitrogênio estudadas, nota-se que Prodex Lac® resulta linha de formação de CB muito semelhante ao controle, com uma concentração (g/L) superior, indicando ser uma excelente alternativa de fonte nitrogênio.

6.3 Efeito da fonte de carbono na formação da membrana

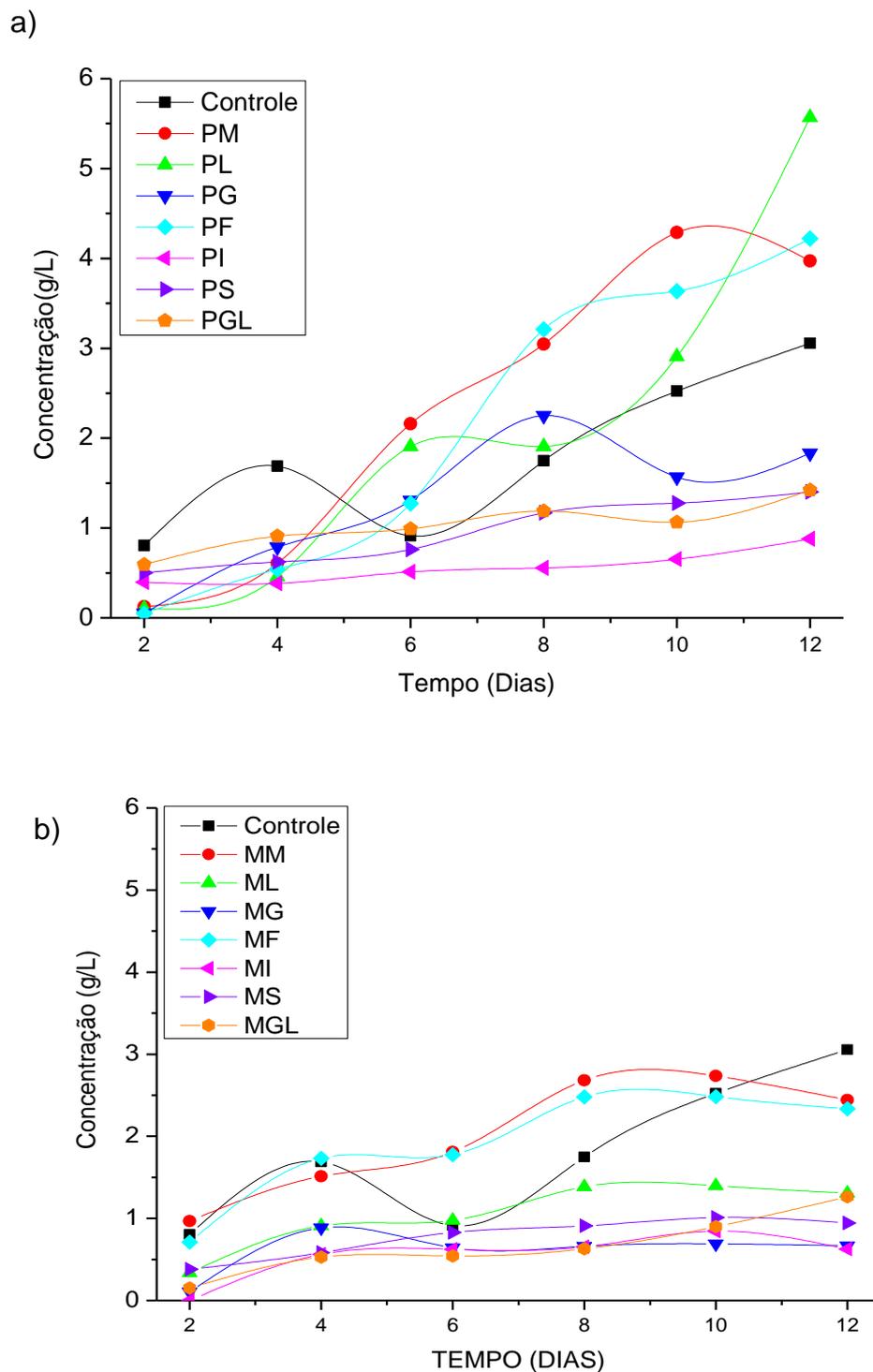
A concentração (g/L) de CB obtida em cada meio modificado ao final dos 12 dias de análise pode ser observadas na Tabela 3, nela pode-se notar que os meios PL, PF e PM resultaram em concentrações maiores que o meio controle de CB.

Tabela 3 - Concentração de CB para diferentes meios

Meio	Concentração de CB (g/L)
CONTROLE	3,054
PL	5,568
PF	4,222
PM	3,972
MM	2,442
MF	2,334
PG	1,832
PGL	1,42
PS	1,402
ML	1,306
MGL	1,262
MS	0,942
PI	0,878
MG	0,668
MI	0,626

Os diferentes comportamentos de crescimento causados na obtenção de celulose bacteriana decorrentes da fonte de carbono, tendo como fonte de nitrogênio milhocina e Prodex Lac®, podem ser vistos na Figura 9.

Figura 9 - Produção de CB com diferentes fontes de carbono; a) Prodex Lac®; b) Nitrogênio



Independente da fonte de nitrogênio, observa-se que todas as fontes de carbono resultam na formação de CB, sendo que os melhores rendimentos foram encontrados em frutose, manitol e lactose.

Nos experimentos que utilizaram frutose, ao fim dos 12 dias, a concentração de CB com milhocina e Prodex Lac® foi de 2,33 g/L e 4,22 g/L, respectivamente. Bae e Shoda (2005) analisaram diferentes meios de cultivo de celulose bacteriana e notaram que a presença de frutose aumenta a concentração de membrana, obtendo uma concentração 47% maior do que quando usado glicose no meio, os autores comentaram que a composição e concentração de açúcares não interferiram na produção de CB, desde que houvesse frutose no meio. Santos e colaboradores (2013) também testaram diferentes fontes de carbono e obtiveram a maior produção (2,7 g/L) quando foi usado frutose no meio de cultivo.

O bom desempenho obtido pelo manitol, 3,972 g/L (Prodex Lac®) e 2,442 g/L (milhocina), também foi observado por alguns autores em outros estudos, Santos e colaboradores (2013) destacam que além da frutose, manitol também resulta em um bom rendimento do CB, obtendo 2 g/L de concentração. Hutchens e colaboradores (2007) compararam manitol e glicose, tendo melhores resultados com o primeiro, cerca de 50% a mais em massa, segundo os autores, manitol é um álcool de açúcar, o qual fornece elétrons para o metabolismo das bactérias e estimula um maior rendimento de celulose em comparação com a glicose.

As concentrações resultantes do uso de lactose, foi de 5,568 g/L no meio contendo Prodex Lac® e apenas 1,306 g/L para o meio contendo milhocina. Para Tsouko e colaboradores (2015), no caso da lactose, a concentração baixa de CB obtida pode ser atribuída ao fato de que as bactérias da família *Gluconacetobacter*, não possuem o gene que codifica a β -galactosidase, a enzima responsável pela hidrólise da lactose. Porém, juntamente com Prodex Lac®, podemos observar um comportamento atípico, resultando em alta concentração de CB, indicando que a fonte de nitrogênio pode influenciar na síntese.

Com relação ao baixo desempenho de produção da glicose, 1,832 g/L e 0,668 g/L, para Prodex Lac® e milhocina, respectivamente, este também é relatado por Santos e colaboradores (2013), que obteve apenas 1,2 g/L com essa mesma fonte de carbono, e justifica relacionando a produção de CB com o consumo da fonte de carbono, uma vez que mostra que a glicose é consumida mais rapidamente que as demais fontes. Além disso, a glicose pode ser facilmente transportada através da membrana celular e incorporada na via biosintética de celulose; No entanto, foi indicado que a maioria da glicose é convertida em subproduto de ácido glucônico, o que diminui o pH da cultura, causando menor produção de CB (ZHONG *et al.*, 2013).

O uso de glicerol não mostrou bom resultados de concentração, 1,42 g/L quando associado com Prodex Lac® e 1,262 g/L juntamente com milhocina, divergindo dos estudos relacionados, onde o mesmo apresentou bons resultados, chegando a concentração de 9 g/L (ANTÔNIO *et al.*, 2012) e 3,5 g/L (TSOUKO *et al.*, 2015), indicando que a interação entre fonte de nitrogênio a carbono pode influenciar na síntese de CB. O mesmo ocorreu quando utilizado sacarose, como fonte de carbono, que resultou em baixas concentrações, 1,402 g/L no meio contendo Prodex Lac® e 0,942 g/L para meio com milhocina, enquanto na literatura, (TSOUKO *et al.*, 2015) relata obter concentração de 4,9 g/L.

De todas as fontes de carbono investigadas, inulina apresentou as menores concentrações, 0,878 g/L para Prodex Lac® e 0,626 g/L para milhocina, tal fato pode ser justificado pela complexibilidade das ligações presentes neste polímero. TIBONI (2011) sugere a utilização de fruto-oligossacarídeos (FOS) como fonte alternativa de carbono, este pode ser obtido através de inulina hidrolisada com catalisadores brandos, como ácido fosfórico e ácido cítrico, desta maneira, a bactéria sintetiza mais facilmente este açúcar, aumentando a conversão do mesmo em CB.

Todos esses resultados mostram que o processo de síntese de celulose em bactérias é complexo e é afetado por muitos fatores. A produção de CB melhorada pode depender da utilização efetiva da fonte de carbono. Uma vez que diferentes bactérias possuem diversas enzimas e diferenças metabólicas, elas podem utilizar vários tipos de carbono para crescimento e produção de CB em diferentes eficiências (ZHONG *et al.*, 2013).

6.4 Avaliação do método de purificação

Para avaliar a eficácia do método de purificação foram utilizados os métodos de TGA e FTIR. Para fins de comparação, foram utilizadas as caracterizações das amostras cultivadas em meio Controle. A Figura 10 mostra a curva TGA obtida da análise feita nas membranas purificadas pelos diferentes métodos e a Figura 11 refere-se às derivadas de massa obtidas a partir das análises.

Figura 10 - Curva TGA de amostras purificadas por diferentes métodos

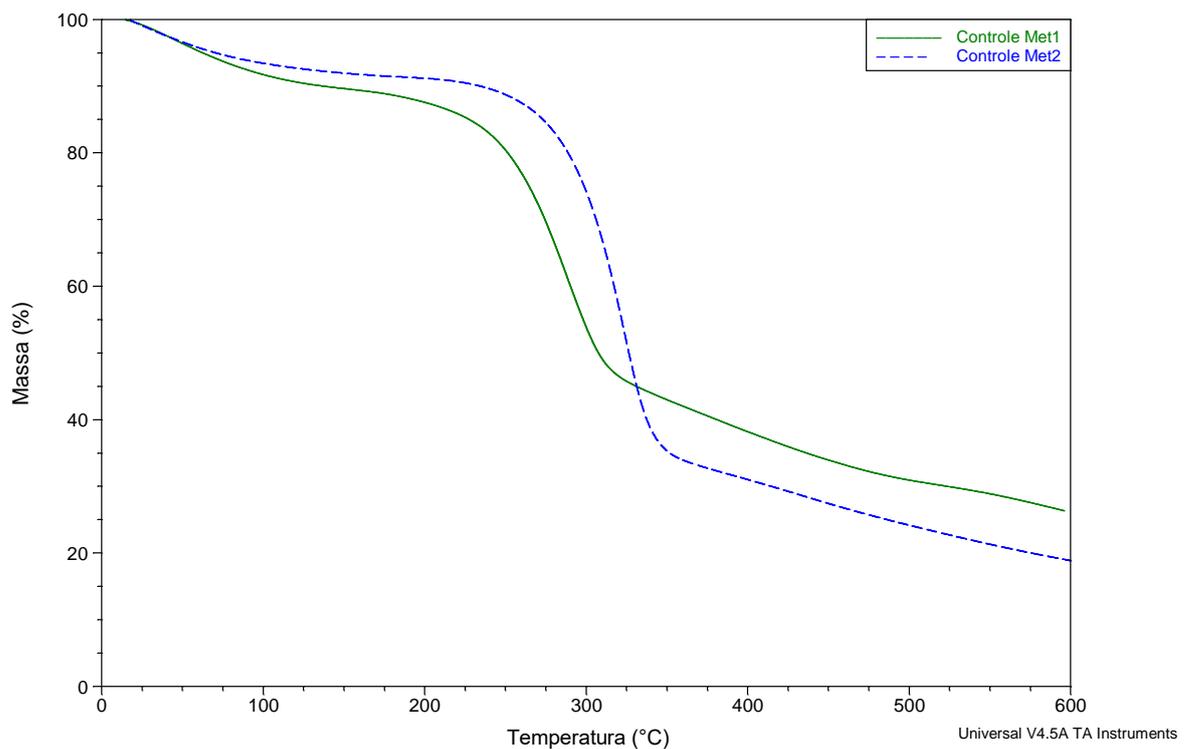
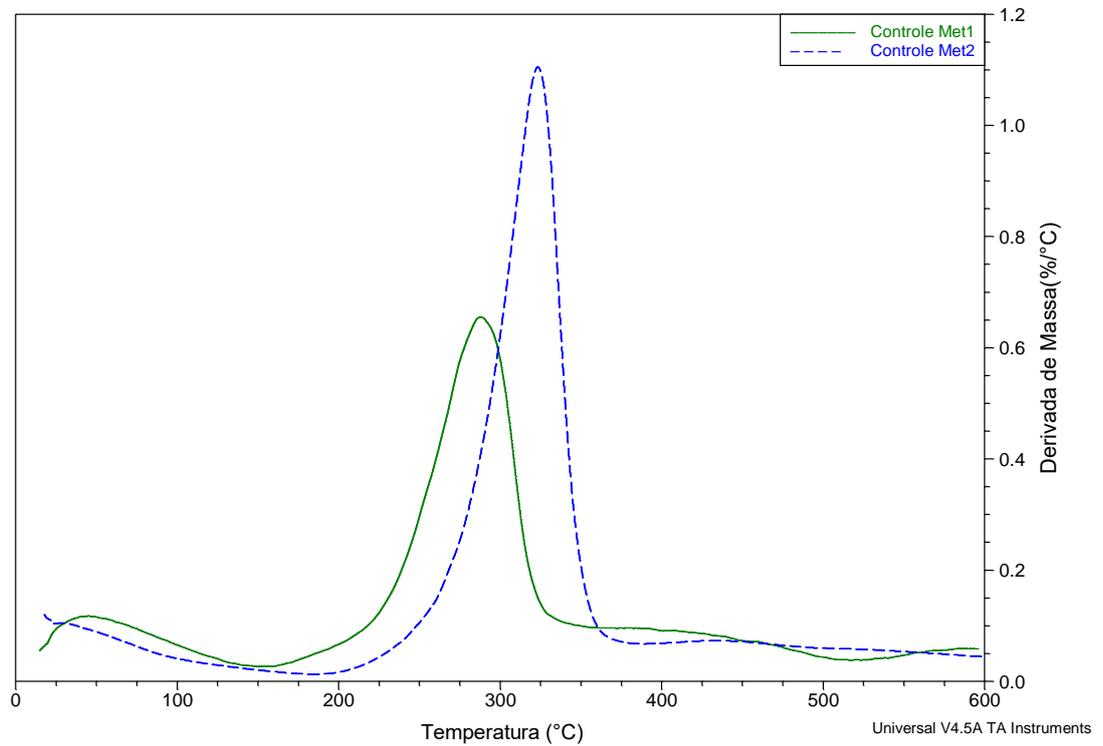


Figura 11 - Derivada TGA de amostras purificadas por diferentes métodos



A Tabela 4 relaciona todos os valores obtidos através das análises termogravimétricas. O perfil de degradação da CB purificada pelo método 1 mostra a ocorrência de quatro eventos de perda de massa. O primeiro evento térmico está associado a perda de água superficial que vai de 30 a 150 °C, equivalente a evaporação de água, este mesmo comportamento pode ser observado na amostra purificada pelo segundo método, evidenciando a elevada capacidade de absorção da CB (GEA *et al.*, 2011a; LIMA, 2014; LIMA *et al.*, 2015).

Amostra	Tmax1 (°C)	Tmax2 (°C)	Tmax3 (°C)	Tmax4 (°C)	Tons et3 (°C)	% Massa1	% Massa2	% Massa3	% Massa4	% Resíduo
CONTROLE-MET1	40,7	159,3	275,9	418,3	254,3	19,82	5,65	26,35	14,98	33,14
CONTROLE-MET2	49,54	*	323	439	295	8	*	56	21	15

O segundo evento térmico, para a membrana purificada seguindo o primeiro método, que ocorreu em $T_{\text{máx}2} = 159,30 \text{ } ^\circ\text{C}$, com 5,65 % de perda de massa não é comum para celulose bacteriana. GEA *et al.* (2011) avaliou métodos de purificação, e constatou que esse evento térmico é decorrente de impurezas não removidas na lavagem. Como esse segundo pico apresenta temperatura baixa, não se trata de um material polimérico, que sofre decomposição a uma temperatura bem mais alta. Desta forma, este resultado pode indicar a presença de impurezas na celulose bacteriana, provavelmente do meio de cultivo, apontando que o processo de purificação não foi eficiente. Na membrana recuperada pelo método 2 este fenômeno não mais ocorre, confirmando a assertiva de que este evento térmico é reflexo do processo de purificação.

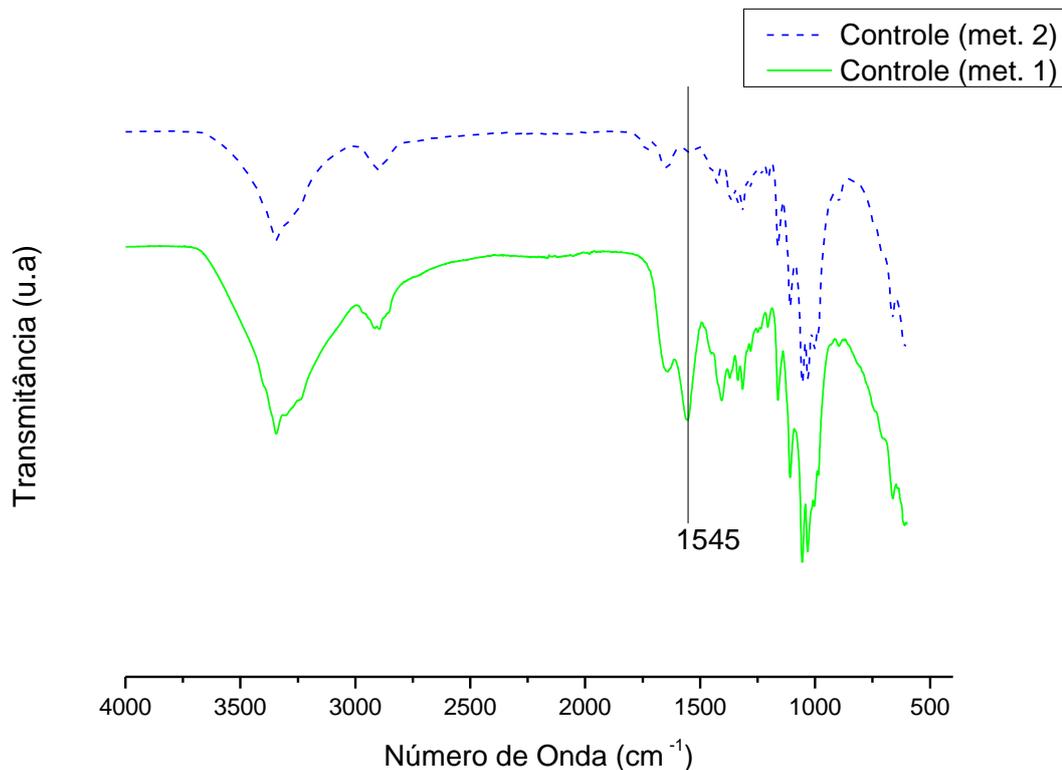
O terceiro pico, mais acentuado, pode ser atribuído à degradação da celulose, inclui a despolimerização, decomposição das unidades de glicose e desidratação. A temperatura de início da degradação (T-onset) obtida foi de $254,30 \text{ } ^\circ\text{C}$ e a temperatura onde a taxa de degradação é máxima (T-máx.) foi de $287 \text{ } ^\circ\text{C}$ com perda de massa de 25,35 %, (GEA *et al.*, 2011a) em seu estudo observou que esse mesmo pico, para CB devidamente purificada, deve ser de $359 \text{ } ^\circ\text{C}$, enquanto que uma purificação de apenas um passo deve resultar em uma T-max de $322 \text{ } ^\circ\text{C}$, em contra partida, a membrana sem nenhum tipo de purificação, apresentou degradação a uma temperatura de $289 \text{ } ^\circ\text{C}$, evidenciando que o polímero purificado pelo método 1 apresenta propriedades térmicas inferiores, fato decorrente do processo de lavagem da CB. Neste aspecto, a membrana purificada de acordo com o método 2, está mais compatível com o exposto pelo autor, tendo como temperatura máxima (T-máx.) $323 \text{ } ^\circ\text{C}$ e temperatura de início da degradação (T-onset) igual a $280 \text{ } ^\circ\text{C}$. No entanto, nota-se que é possível aprimorar o método de purificação, prevendo melhorar ainda mais as propriedades térmicas de CB.

O quarto evento representa a degradação de resíduos carbonáceos que se estende até cerca de $481,30 \text{ } ^\circ\text{C}$, com perda de massa de 33,14 %, sendo que o resíduo de massa ao final da caracterização foi de 26%. O percentual de resíduo encontrado também não confere com a literatura, segundo GEA e

colaboradores (2011) o valor máximo esperado de resíduo deve ser em torno de 15 %, para o autor, isto pode ser explicado pela presença de compostos de fósforo, como impurezas iniciais. Seguindo esta referência, também pode-se constatar que o segundo método foi eficaz, uma vez que o percentual de massa residual foi de 15%

A Figura 12 ilustra a comparação entre as espectroscopias de absorção no infravermelho (FTIR) de amostras de CB recuperadas por diferentes métodos, a fim de identificar compostos químicos presentes na estrutura.

Figura 12 - FTIR de amostras purificadas por diferentes métodos



A análise de FTIR foi conduzida de modo a encontrar evidências de que o segundo método foi mais eficiente na remoção de impurezas inerentes ao meio de cultivo. Para tanto, procurou-se entender quais bandas poderiam ser indicativas da presença de material não removido na lavagem da membrana, as bandas encontradas estão descritas na Tabela 5. Diante disso, o pico localizado em 1545 cm^{-1} , que corresponde à absorção de proteína amida II, desapareceu na amostra

tratada utilizando segundo método, indicando que este é mais eficiente na remoção de impurezas (GEA *et al.*, 2011b; PECORARO *et al.*, 2008).

Tabela 4 - Dados de FTIR para membranas de CB purificadas por dois diferentes métodos

TIPO DE LIGAÇÃO	Nº de onda característico de CB (cm-1)	CONTROLE MET1	CONTROLE MET2
<i>u(O-H) Celulose I</i>	3500 - 3300	3343	3338
<i>u(CH); ua (CH2)</i>	3000 - 2870	2896	2896
<i>proteína amida II</i>	1545	1545	*
<i>δ(HCH, OCH) no plano</i>	1330- 1430	1405	1428
<i>u C-O (C-O-H)</i>	1100 - 1200	1206	1161
<i>ua (C-O-C)</i>	1000 - 1150	1160	1107
<i>δ no plano CH2 δ C-H</i>	700 - 900	900	897
<i>δ(C-O-H), fora do plano</i>	700 -400	663	663

6.5 Caracterizações

6.5.1 Substrato

Para a realização dos cálculos de consumo dos açúcares redutores (glicose, frutose e lactose) pelo método do DNS, foram utilizadas as equações obtidas através das curvas de calibração de absorvância em 540 nm.

Para identificar a eficiência do uso do substrato, a cinética de formação de CB durante o experimento foi medida. Os Parâmetros utilizados foram, consumo de açúcar (S) em g/L e massa de CB seca por volume de meio (P) em g/L. As curvas resultantes estão ilustradas no Apêndice A.

Os parâmetros de cinética de produção, mostrados na Tabela 6, foram então medidos da seguinte forma:

- Açúcar consumido (%) = $\frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100$
- Açúcar convertido (%) = $\frac{Y}{A_i - A_f} \times 100$
- R_s = taxa de utilização do açúcar (g/L/h)
- R_P = taxa de formação de CB (g/L/h)
- $Y_{P/S}$ = o rendimento CB em relação ao substrato de glicose (g/g)

Onde:

A_i = concentração inicial de açúcar (g/L);

A_f = concentração final de açúcar (g/L);

Y = rendimento CB (g/L).

Tabela 5 - Dados referentes a consumo de açúcar e produção de CB

Meio	Açúcar consumido (%)	Açúcar convertido (%)	R_s (g/L/dia)	R_P (g/L/dia)	Y (g/g)
PG	3,08%	332%	0,0485	0,1525	3,32
PF	55,61%	40%	0,875	0,352	0,402
PL	32,85%	98%	0,474	0,464	0,978
MG	62,00%	6%	0,926	0,056	0,06
MF	43,00%	30%	0,643	0,195	0,302
ML	24,60%	30%	0,377	0,302	0,299

Ao avaliar os dados fornecidos através da análise de consumo de substrato, podemos verificar que o meio que apresentou menor percentual de fonte de carbono utilizada durante o cultivo foi PG (3%), enquanto MG foi o meio que mais consumiu o açúcar durante a formação de CB (62%), ambos eram meios que utilizavam glicose. Em questão a conversão de açúcar em membrana de CB, o meio que apresentou maior percentual foi PG (332%), no entanto, vale ressaltar que a concentração final de CB neste foi baixa em comparação as demais. A taxa de consumo de substrato, mostra que MG resulta em alto demanda de glicose diária, porém apenas 6% do açúcar consumido é convertido em CB. As taxas de produtividade evidenciam que os meios com melhores resultados foram PF e PL, os quais apresentaram taxas de conversão de 40 e 98%, respectivamente.

6.5.2 Análise termogravimétrica - TGA

As Figura 13 e 14 mostram as curvas de análise termogravimétrica (TGA) obtidas para a celulose bacteriana controle e a celulose bacteriana sintetizada a partir de diferentes fontes de carbono, as amostras referem-se ao método de purificação 2. As curvas TGA representam o percentual de massa perdida em função da temperatura e as curvas DTG representam a primeira derivada das curvas TG. A Tabela 7 relaciona os dados determinados a partir das curvas.

Figura 13 - Curvas TGA (a) e DTG (b) da CB produzida com milhocina e diferentes fontes de carbono

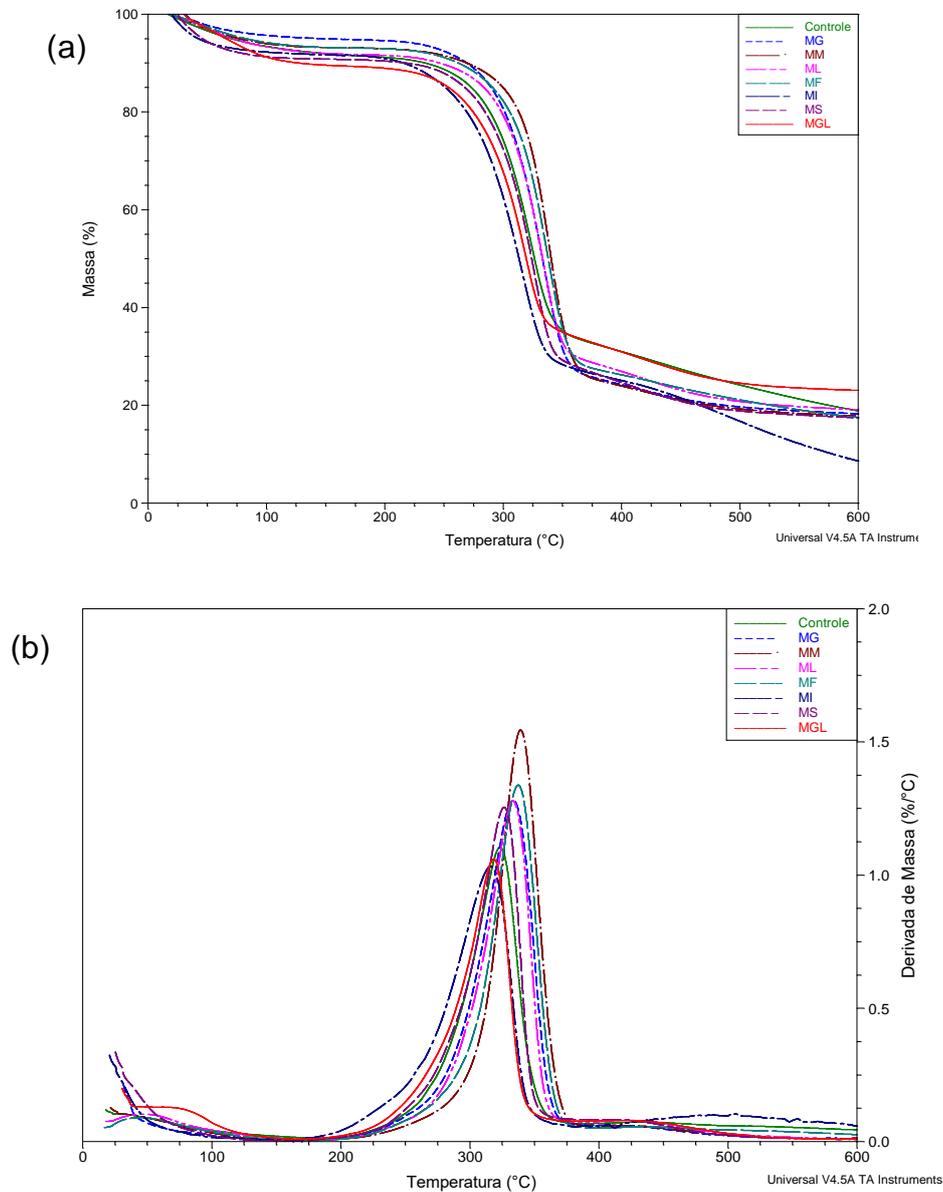


Figura 14 - Curvas TGA (a) e DTG (b) da CB produzida com Prodex Lac® e diferentes fontes de carbono.

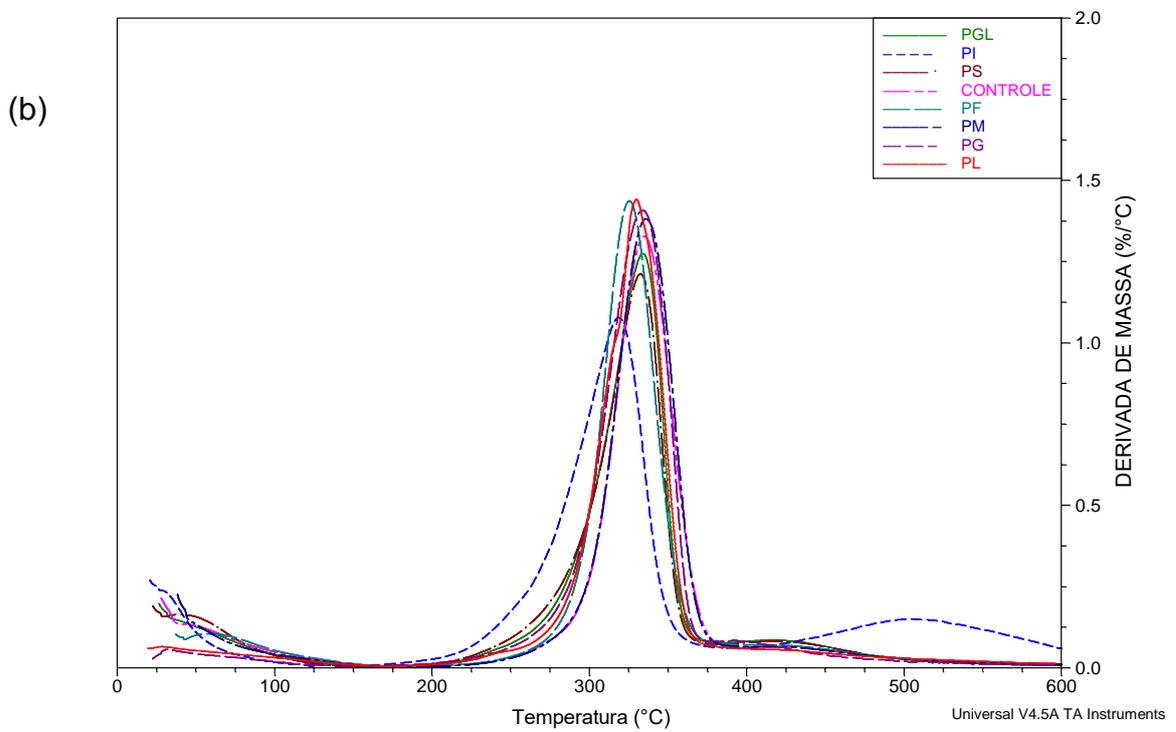
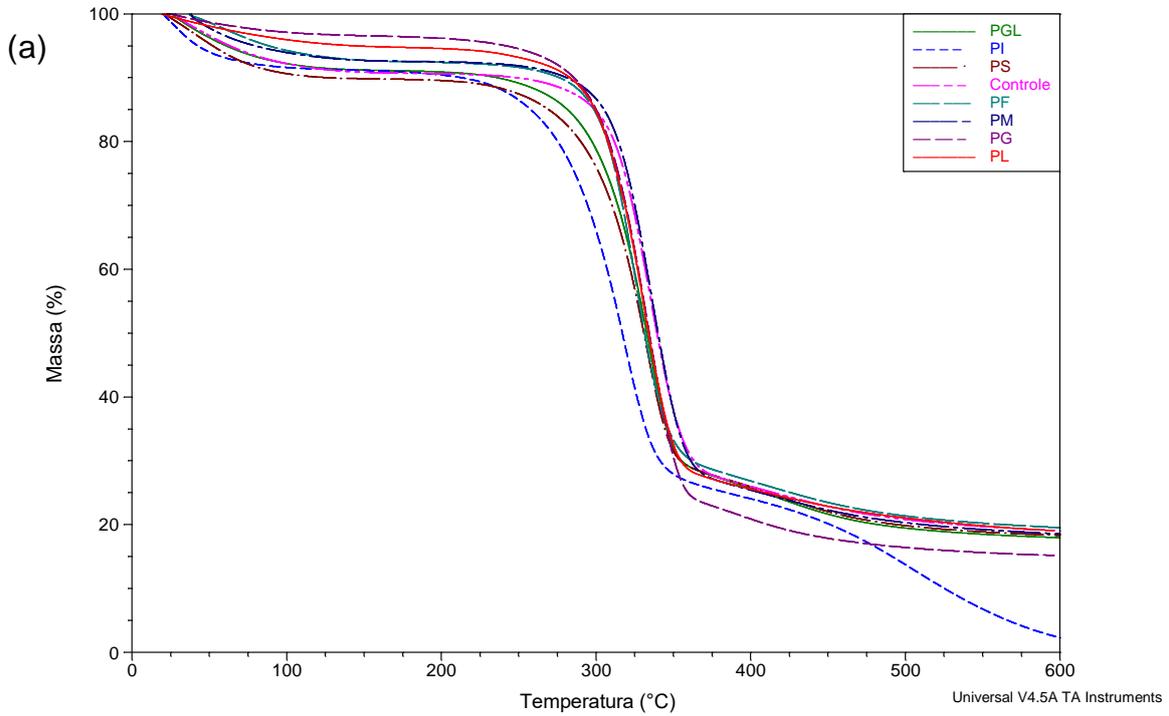


Tabela 6 - Relação de dados determinados a partir das curvas TGA e DTG

Amostra	Tmax1 (°C)	Tmax2 (°C)	Tmax3 (°C)	T onset (°C)	% Massa1	% Massa2	% Massa3	% Residuo
MM	44,68	339	434	311	6	66	10	18
MF	44,9	337	442	310	6	63	15	16
MG	48,36	333	432	306	4	68	10	18
ML	49,58	332	428	298	7	62	12	19
MS	55,57	326	424	304	9	62	12	17
MGL	38,86	318	428	285	9	53	15	23
MI	49,85	316	505	270	8	63	20	9
PM	62	335	431	311	6	65	11	18
CONTROLE	37,5	334,8	435,8	309	8	62	11	19
PGL	79	333	422	302	7	62	13	18
PS	51	332	427	305	9	63	9	19
PF	66	325	434	303	7	63	11	19
PI	53	318	504	282	8	60	29	3
PG	33	333	402	297	4	71	10	15
PL	30	329	433	296	6	66	10	18

O perfil de degradação das membranas de CB mostra a ocorrência de três eventos de perda de massa. O primeiro evento térmico está associado a perda de água superficial que vai de 30 a 150 °C, equivalente a evaporação de água, evidenciando a elevada capacidade de absorção da CB (GEA *et al.*, 2011a; LIMA, 2014; LIMA *et al.*, 2015)

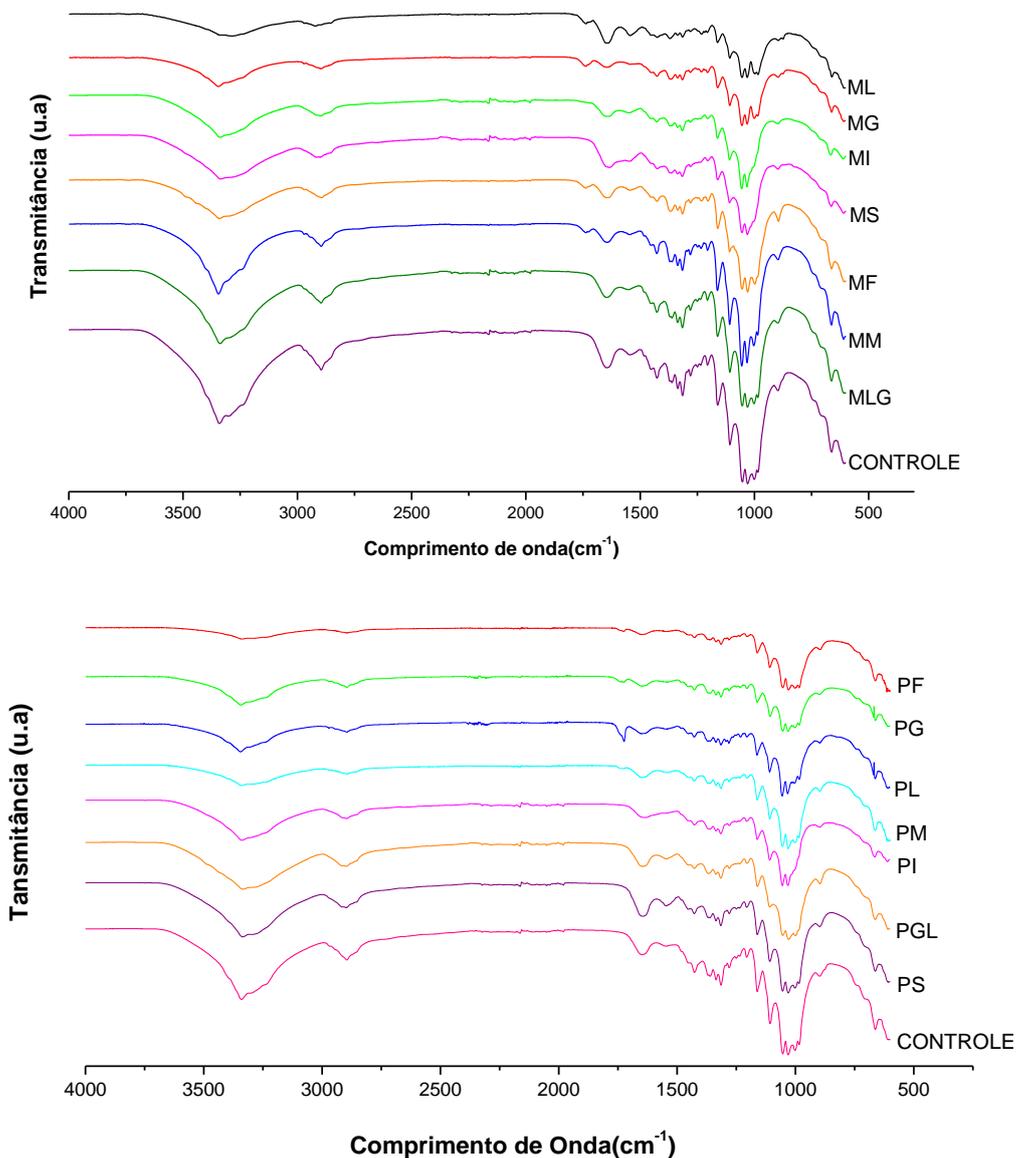
O segundo pico, mais acentuado, pode ser atribuído à degradação da celulose, inclui a despolimerização, decomposição das unidades de glicose e desidratação. A temperatura onde a taxa de degradação é máxima (T-máx.) mostrou-se entre 318 °C e 339 °C, sendo que as mais estáveis termicamente foram MM (339 °C), MF (337 °C) e PM (335 °C), superando os resultados da amostra controle. Verifica-se ainda que os meios que proporcionaram maior concentração de CB foram os mesmos que também apresentaram melhores resultados nas análises térmicas, bem como os meios que tiveram menor concentração de membrana foram, justamente, os que mostraram menores propriedades térmicas, como PI (318 °C) e MI (316 °C).

O terceiro evento representa a degradação de resíduos carbonáceos que se estende até cerca de 500 °C. e o percentual médio de resíduo encontrado, 16 % confere com a literatura, segundo GEA e colaboradores (2011) o valor esperado de resíduo deve ser em torno de 15 %

6.5.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier - FTIR

A FTIR da membrana de CB obtida nos diferentes meios de cultivo foi realizada a fim de determinar a ocorrência de novos picos ou a alteração de qualquer pico que pudesse ser atribuída à interação entre os componentes do meio de cultivo e a celulose. Os espectros de resultantes das amostras sintetizadas sob diferentes meios e purificadas pelo método 2 estão apresentados na Figura 15.

Figura 15 - Espectro de FTIR de CB



Os principais grupos funcionais característicos da celulose bacteriana com suas principais bandas e respectivas atribuições, encontradas nos materiais estudados, são mostrados na Tabela 7. Os espectros de FTIR das amostras analisadas seguem o perfil característico da celulose bacteriana conforme reportado na literatura (PECORARO *et al.*, 2008).

Tabela 7 - Dados obtidos da análise de FTIR.

TIPO DE LIGAÇÃO	Nº de onda característico de CB (cm-1)	CONTROLE	MGL	MI	MS	ML	MF	MG	MM
<i>u(O-H) Celulose I</i>	3500 - 3300	3341	3338	3341	3335	3315	3343	3328	3351
<i>u(CH); ua (CH2)</i>	3000 - 2870	2897	2896	2895	2915	2895	2895	2895	2895
<i>δ(HCH, OCH) no plano</i>	1330- 1430	1427	1428	1370	1423	1377	1423	1370	1423
<i>u C-O (C-O-H)</i>	1100 - 1200	1161	1161	1161	1161	1165	1172	1165	1157
<i>ua (C-O-C)</i>	1000 - 1150	1107	1107	1109	1109	1104	1112	1097	1104
<i>δ no plano CH2 δ C-H</i>	700 - 900	897	897	897	897	884	899	876	892
<i>δ(C-O-H), fora do plano</i>	700 -400	662	663	610	610	657	664	657	664

TIPO DE LIGAÇÃO	Nº de onda característico de CB (cm-1)	CONTROLE	PGL	PI	P.S	PM	PF	PG	PM
<i>u(O-H) Celulose I</i>	3500 - 3300	3341	3335	3342	3339	3335	3327	3332	3346
<i>u(CH); ua (CH2)</i>	3000 - 2870	2895	2898	2897	2902	2901	2892	2898	2904
<i>δ(HCH, OCH) no plano</i>	1330- 1430	1360	1427	1428	1428	1422	1422	1421	1422
<i>u C-O (C-O-H)</i>	1100 - 1200	1161	1161	1161	1161	1153	1163	1157	1148
<i>ua (C-O-C)</i>	1000 - 1150	1107	1108	1108	1107	1052	1070	1087	1097
<i>δ no plano CH2 δ C-H</i>	700 - 900	900	897	897	898	895	885	868	892
<i>δ(C-O-H), fora do plano</i>	700 -400	662	662	664	662	673	655	671	658

A banda na região de 3300 a 3500 cm⁻¹, segundo PECORARO E COLABORADORES (2008), é característico do estiramento dos grupos hidroxila presentes em todas as amostras. Além desta, outra principal

atribuição que caracteriza o polímero é o estiramento CH e estiramento assimétrico entre 2870 e 3000 cm^{-1} , também encontrado em todas as amostras; Várias outras bandas relevantes características da CB, conforme elucidado na Tabela 6, foram encontradas nas amostras analisadas, muitas delas relacionadas com ligações OH e CH. Nota-se que o meio de cultura influencia nas características químicas, uma vez que, através dos gráficos percebe-se alguns dos picos menos acentuadas em determinadas amostras em comparação ao controle.

6.5.4 Microscopia eletrônica de varredura - MEV

A caracterização morfológica de membranas de CB obtidas por diferentes meios de cultivo foi realizada por MEV em vários aumentos. A Figura 16 mostra micrografia de uma amostra produzida em meio controle, outros dois grupos selecionados de micrografias referentes as amostras de CB produzidas utilizando milhocina ou Prodex Lac® como fontes de nitrogênio e diferentes fontes de carbono podem ser visualizados, respectivamente nas Figuras 17 e 18. De um modo geral, as micrografias mostram estrutura em rede, formada por um emaranhado de fibras nanométricas aleatoriamente distribuídas, característica da celulose bacteriana.

Figura 16 - Micrografia de CB, produzida em meio Controle

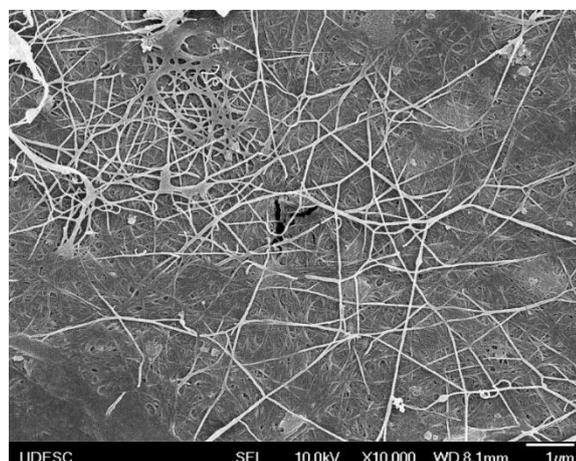


Figura 17 – Micrografias de CB obtidas a partir de Milhocina e diferentes fontes de carbono. a) MF; b) MG; c) MGL; d) MI; e) ML; f) MM e g) MS.

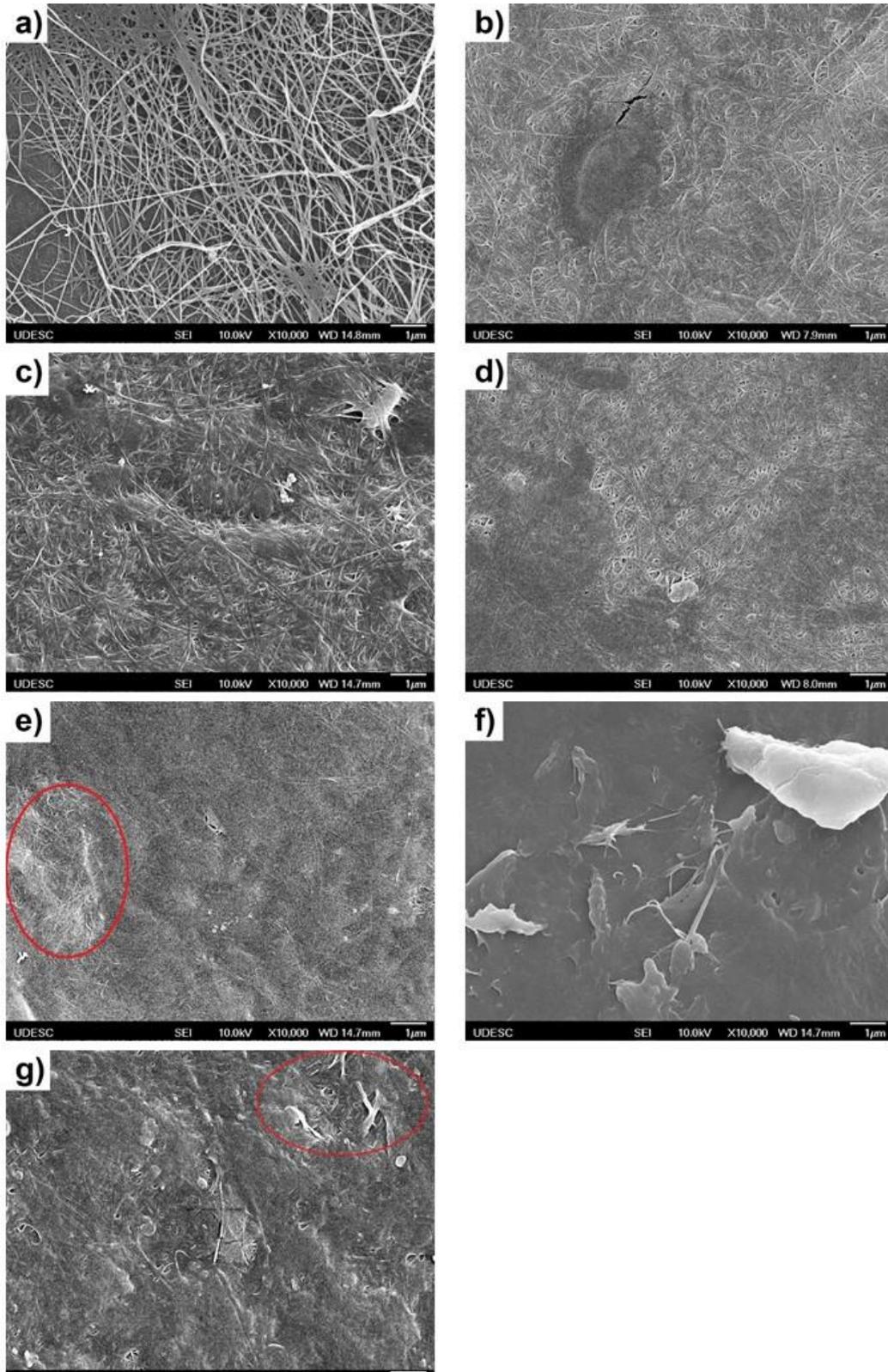
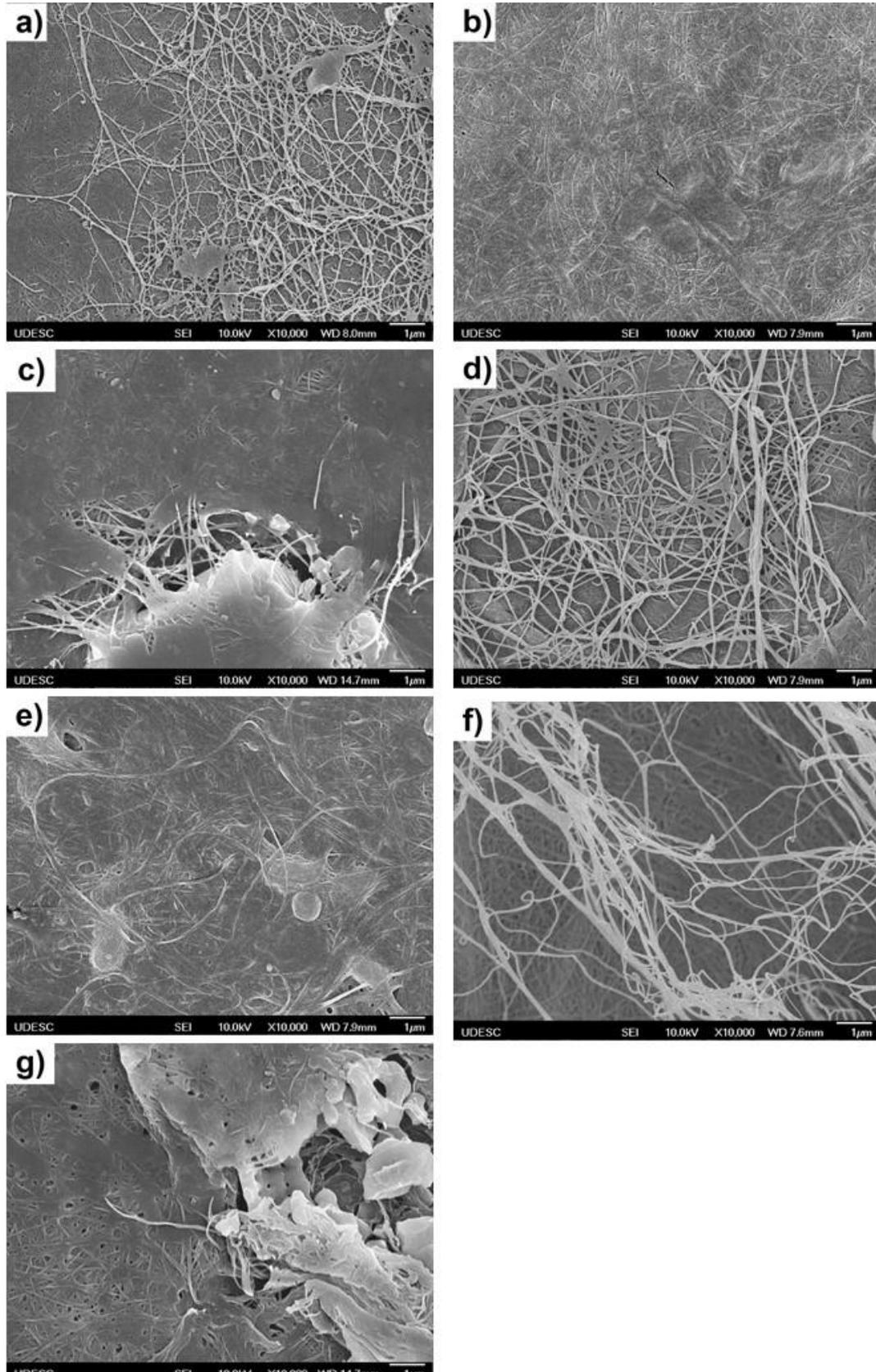


Figura 18 – Micrografias de CB obtidas a partir de Prodex Lac® e diferentes fontes de carbono. a) PF; b) PG; c) PGL; d) PI; e) PL; f) PM e g) PS.



Como observado na figura 16, a amostra produzida em meio contendo extrato de levedura, peptona e manitol (controle) apresenta de forma nítida a presença de nanofibras e também a existência de poros, ambas, fortes características morfológicas da CB características. A CB produzida em meio utilizando milhocina e frutose (Figura 17a) mostrou uma boa dispersão das nanofibras dentro da matriz, com a presença de poros, sem agregados visíveis, similar a outras micrografias típica da CB encontradas na literatura. As amostras ilustradas nas Figuras 18a (frutose), 18d (inulina) e 18f (manitol), todos em meio a Prodex Lac®, seguem este mesmo padrão, indicando que as amostras atendem aos aspectos descrito em literatura (RECOUVREUX, 2008; BARUD, 2010; NASCIMENTO, 2014).

A amostra de CB produzida em meio contendo milhocina e glicerol (Figura 17c) também apresentou boa dispersão das nanofibras na matriz, porém de forma lisa e densa, ou seja, sem a presença de poros, característica esta que também pode ser observada nas amostras cultivada em meio de Prodex Lac® e glicose (Figura 18b) e lactose (Figura 18e). Também se apresentarem lisas e densas, porém com fibras nanométricas, as amostras advindas dos meios, milhocina e glicose (Figura 17b) e milhocina e inulina (Figura 17d).

As membranas de CB produzidas em meio contendo milhocina e lactose (Figura 17e) e milhocina e sacarose (Figura 17g) também se mostraram lisas e densas. Entretanto, embora tenha sido observada a presença de nanofibras em algumas regiões, as mesmas estão heterogeneamente dispostas na matriz, conforme destacado nas figuras (círculo). A mesma análise pode-se fazer para as membranas obtidas em meio de cultivo contendo Prodex Lac® e glicerol (Figura 18c), sacarose (Figura 18g)

Por fim, na micrografia da membrana de CB produzida em meio contendo milhocina e manitol (Figura 17f) não é possível observar as nanofibras na matriz, sendo que essa membrana se mostrou lisa, densa e com a presença de agregados de coloração esbranquiçada.

Mohammadkazemi, Azin e Ashori, (2015) avaliaram a produção de CB em diferentes fontes de carbono e meios de cultivo, e verificaram que o meio pode resultar em diferentes morfologias.

Todas as membranas de CB tendem a apresentarem estrutura similar, porém o tamanho e a quantidade dos poros são diferentes, devido à interação dos componentes dos meios e as fibras de celulose.(VIEIRA, 2013)

Essas diferenças podem influenciar a aplicação final de celulose, onde são necessárias estruturas mais porosas ou compactas para criar um determinado dispositivo ou produto (JOZALA *et al.*, 2014).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram que foi possível a obtenção de CB, em diferentes meios, variando fontes de nitrogênio e de carbono, por meio da bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, em cultura estática.

Dentre as fontes de nitrogênio analisadas, Prodex Lac® se mostrou mais eficiente, resultando em maiores concentrações de CB; com relação as fontes de carbono, frutose, manitol e lactose apresentaram maiores concentrações comparadas as demais;

As membranas purificadas por meio do Método 2 mostraram visivelmente uma melhor estabilidade térmica, e através do FTIR pode-se constatar a remoção de compostos químicos características de impurezas, sendo este mais eficaz que o Método 1.

Os resultados de TGA indicam que todas as membranas possuem comportamento térmico similar, sendo que as mais estáveis termicamente foram MM (339 °C), MF (337 °C) e PM (335 °C). Os resultados de FTIR mostram que quimicamente as diferentes amostras são equivalentes com as estruturas citadas em literatura. As micrografias comprovaram que o meio pode influenciar na morfologia da CB, mas de forma geral, todas apresentaram nanofibras, característica importante na membrana.

Seguindo a estrutura apresentada, conclui-se que a formação de CB utilizando meios alternativos e de baixo custo é viável, e que o material obtido atende as propriedades, térmicas, físicas e químicas esperadas.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

É necessário ressaltar que com este trabalho não esgota este assunto. Sendo assim, são muitas as possibilidades de trabalhos futuros. Abaixo algumas sugestões para trabalhos referentes à CB:

- Testar os meios que tiveram os melhores resultados com maiores concentrações de nitrogênio;
- Testar meios com combinações de fontes de nitrogênio, e/ou fontes de carbono vindas de reaproveitamento de alimentos;
- Avaliar se mais um passo de purificação da membrana poderia resultar em melhores propriedades térmicas;
- Caracterizar as amostras obtidas por meio de teste de tração para conhecer as propriedades mecânicas;

REFERÊNCIAS

- ANTÔNIO, R. V. *et al.* Produção De Celulose Bacteriana a Partir De Diferentes Substratos. **Revista técnico Científica (IFSC)**, v. 3, n. 1, p. 176–182, 2012.
- BAE, S. O.; SHODA, M. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 1, p. 45–51, 2005.
- BARUD, H. S. Novos Materiais Multifuncionais Baseados em Celulose Bacteriana. p. 172, 2010.
- BIELECKI, S.; KRZYSTYNOWICZ, A.; MARIANNA. Bacterial Cellulose. In: BAETS, S. DE (Ed.). . **Polysaccharides I: Polysaccharides from Prokaryotes**. Belgium: Laboratory of Industrial Microbiology and Biocatalysis Gent University, 2004. v. 1p. 37–46.
- BROWN JR., R. M. Bacterial cellulose. **CELLULOSE: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ASPECTS**, p. 145–151, 1989.
- BROWN JR., R. M. **The biosynthesis of cellulose**, 1996.
- BROWN JR., R. M. Cellulose Structure and Biosynthesis : what is in store for the 21th century? **Journal of Polymer Science**, v. 42, n. February, p. 487–495, 2004a.
- BROWN JR., R. M. **Microbial Cellulose: A New Resource for Wood, Paper, Textiles, Food and Specialty Products**Austin, 2004b.
- BROWN, R. M. J. **MICROBIAL CELLULOSE MODIFIED DURING SYNTHESIS**. U.S.Patente Nº 4,942,128, , 1990.
- BYROM, D. **PROCESS FOR THE PRODUCTION OF MICROBIAL CELLULOSE**. USPatente nº 5,273,891, , 1993.
- CHAWLA, P. R. *et al.* Microbial cellulose: Fermentative production and applications (Review). **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.
- CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: Grãos. **Monitoramento agrícola - Safra 2017**, v. 4, n. 1, p. 1–136, 2017.
- CZAJA, W. *et al.* Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145–151, 2006.
- CZAJA, W. K. *et al.* The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 12, 2007.
- CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN, R. M. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. **Cellulose**, v. 11, n. 3, p. 403–411, 2004.
- DONINI, Í. A N. *et al.* Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Ecletica Química**, v. 35, n. 4, p. 165–178, 2010a.

DONINI, Í. A. N. *et al.* ECLÉTICA. v. 35, p. 165–178, 2010b.

FALLIS, A. . APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DA CADEIA PRODUTIVA DO MILHO PARA CULTIVO DE COGUMELOS COMESTÍVEIS. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

GEA, S. *et al.* Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9105–9110, 2011a.

GEA, S. *et al.* Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource technology**, v. 102, n. 19, p. 9105–10, out. 2011b.

HUTCHENS, S. A. *et al.* Statistical analysis of optimal culture conditions for *Gluconacetobacter hansenii* cellulose production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 175–180, 2007.

IGUCHI, M. *et al.* **Bacterial cellulose-containing molding material having high dynamic strength** U.S. Patente N° 4,742,164, , 1988.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose — a masterpiece of nature ' s arts. **Journal of Materials Science**, v. 5, n. 35, p. 261–270, 2000.

JOZALA, A. F. *et al.* Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1181–1190, 2014.

KLEMM, D. *et al.* Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angew. Chem. Int. Ed**, v. 44, p. 3358–3393, 2005.

LESTARI, P. *et al.* Study on the Production of Bacterial Cellulose from *Acetobacter xylinum* using Agro-Waste. **Jordan Journal of Biological Sciences Volume**, v. 7, n. 1, p. 75–80, 2014.

LIMA, H. L. *et al.* **Celulose bacteriana obtida por diferentes fontes agroindustriais**. Anais do 13º Congresso Brasileiro de Polímeros –. **Anais...Natal: Anais do 13º Congresso Brasileiro de Polímeros**, 2015

LIMA, H. L. S. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO LÍQUIDO DE SISAL E DO SUCO DE CAJU PARA A PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA**. FORTALEZA: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, 2014.

MICHALSKI, E. Z. *et al.* Efeito Da Suplementação De Prodex Na Produção De Celulases E Xilanases Por *Penicillium Echinulatum* Em Cultivos Em Estado Sólido. **XVI Encontro de Jovens Pesquisadores**, p. 1, 2008.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MOHAMMADKAZEMI, F.; AZIN, M.; ASHORI, A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 518–523, 2015.

MOHITE, B. V; PATIL, S. V. Investigation of Bacterial Cellulose Biosynthesis Mechanism in *Gluconoacetobacter hansenii*. **ISRN microbiology**, v. 2014, p. 7, 2014a.

MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. A novel biomaterial: Bacterial cellulose and its new era applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 101–110, 2014b.

NASCIMENTO, E. S. DO. **EXTRATO DE ALGAROBA COMO FONTE ALTERNATIVA PARA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA**. FORTALEZA: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, 2014.

PECORARO, É. *et al.* Bacterial Cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: Preparation, Properties and Applications. In: BELGACEM; GANDINI (Eds.). . **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. Amsterdam: Elsevier, 2008. p. 289–304.

PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1277–1286, 2011.

POLETTI, M.; PISTOR, V.; ZATTERA, A. J. Structural Characteristics and Thermal Properties of Native Cellulose. In: VEN, T. VAN DE; GODBOUT, L. (Eds.). . **Cellulose - Fundamental Aspects**. Rijeka: InTech, 2013.

RECOUVREUX, D. DE O. S. **Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological reviews**, v. 55, n. 1, p. 35–58, 1991.

SAMIR, A. S. A.; ALLOIN, F.; DUFRENSE, A. Review of Recent Research into Cellulosic Whisker, Their Properties and Their Application in Nanocomposites Field. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 612–626, 2005.

SANTOS, S. M.; CARBAJO, J. M.; VILLAR, J. C. The effect of carbon and nitrogen sources on bacterial cellulose production and properties from *gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291 focused on its use in degraded paper restoration. **BioResources**, v. 8, n. 3, p. 3630–3645, 2013.

SOUZA, D. J. **ESTUDO DE BIOCAMPÓSITOS DE POLI(L-ÁCIDO LÁCTICO) (PLLA) COM CELULOSE BACTERIANA VISANDO APLICAÇÃO COMO MEMBRANAS BIOMÉDICAS**. JOINVILLE: UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE, 2012.

TABAI, M. J.; EMTIAZI, G. Comparison of Bacterial Cellulose Production among Different Strains and Fermented Media. **APPLIED FOOD BIOTECHNOLOGY**, v. 3, n. 1, p. 35–41, 2016.

TAIPINA, M. D. O. **Nanocristais de celulose: obtenção, caracterização e modificação de superfície**. Campinas: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2012.

TAKEMURA, H.; JP, H. **CELLULOSE-PRODUCING BACTERIAUS**, 2004.

TIBONI, M. **MONITORAMENTO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO COMPLEXO CELULOLÍTICO UTILIZANDO CELULOSE BACTERIANA COVALENTEMENTE TINGIDA COM AZUL BRILHANTE DE REMAZOL R**. curitiba: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ MARCELA TIBONI MONITORAMENTO, 2011.

TSOUKO, E. *et al.* Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 14832–14849, 2015.

VIEIRA, D. C. M. **Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por *Gluconacetobacter xylinus* em meio de resíduos de frutas e folhas de chá verde.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2013.

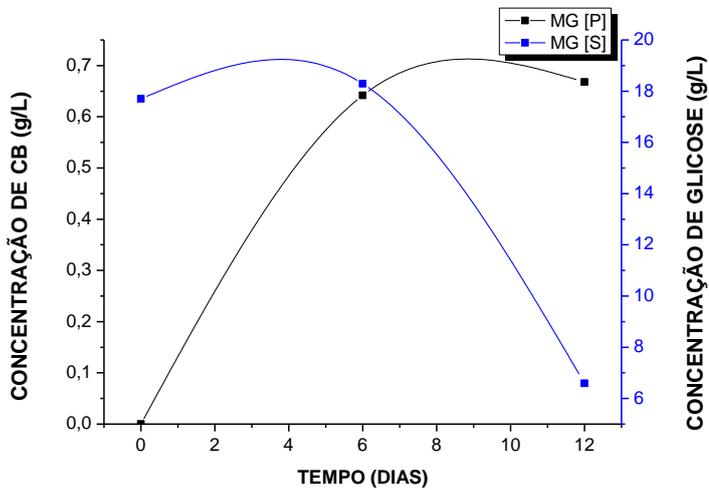
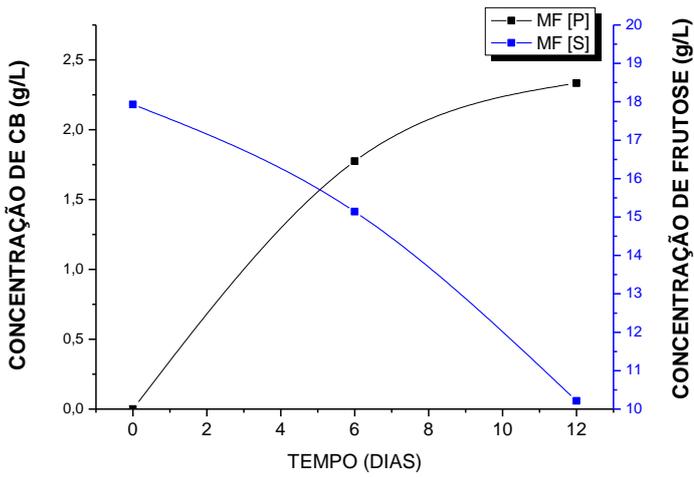
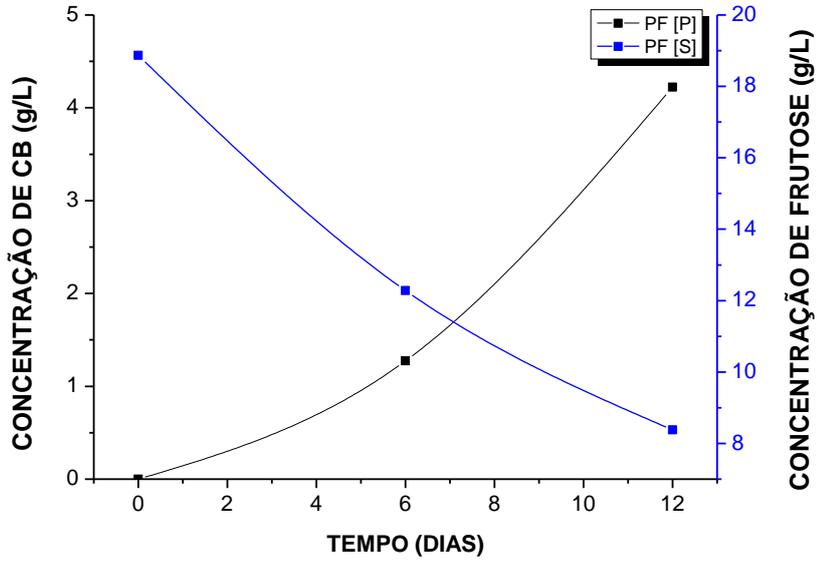
YAMADA, Y. *et al.* **Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae)***J. Gen. Appl. Microbiol*, 2012. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam/58/5/58_397/_pdf>. Acesso em: 20 set. 2017

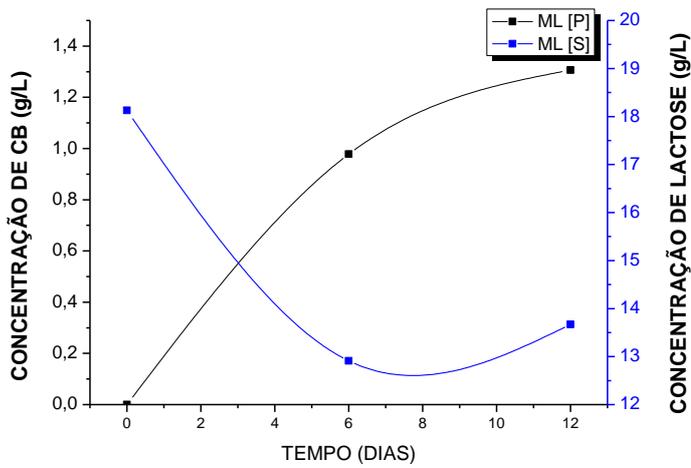
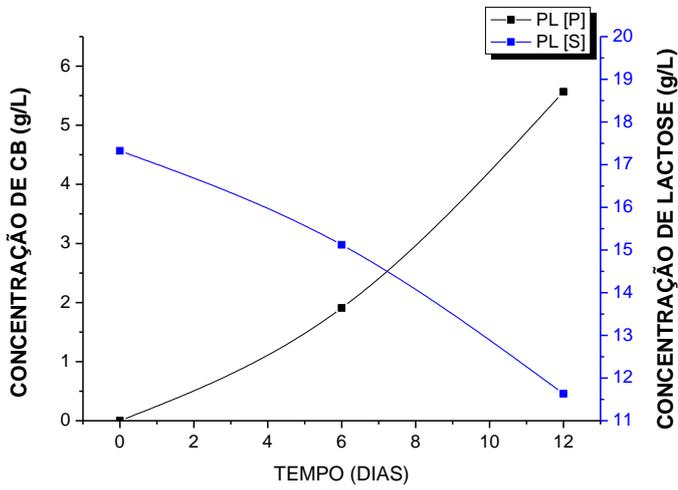
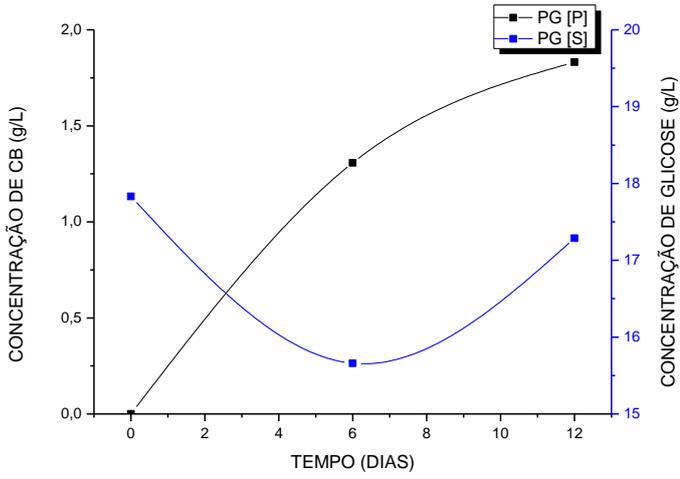
YAMADA, Y.; HOSHINO, K.-I.; ISHIKAWA, T. The Phylogeny of Acetic Acid Bacteria Based on the Partial Sequences of 16S Ribosomal RNA: The Elevation of the Subgenus *Gluconoacetobacter* to the Generic Level t. **Biosd Biotech. Bio**, v. 61, n. 8, p. 1244–1251, 1997.

ZANOTTO, C. **CARACTERIZAÇÃO DE RESÍDUO DA INDÚSTRIA DE BENEFICIAMENTO DE MILHO.** Pato Branco: Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), 2011.

ZHONG, C. *et al.* Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. **Appl Microbiol Biotechnol**, p. 12, 2013.

APÊNDICE A





AUTORIZAÇÃO

Nome do autor: Biassander Camila Tureck

RG: 5018764

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeito Do Meio De Cultivo E Do Tratamento De Purificação Nas Propriedades Térmicas E Químicas De Celulose Bacteriana.

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 09 de fevereiro de 2018.

Biassander Camila Tureck

Assinatura do aluno